

# SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
<b>PRESENTATION DU CNESTEN</b>	
I. Présentation du CNESTEN.....	4
1. Mise en service du Centre d'Etudes Nucléaires de la Maâmora .....	4
2. Situation géographique .....	4
3. Missions principales du CNESTEN .....	5
II. Organigramme générale du CNESTEN .....	5
<b>PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
I. Introduction .....	8
II. Présentation générale des pesticides .....	9
1. Définitions .....	9
a. Pesticides .....	9
b. Résidu de pesticides .....	9
2. Compositions .....	9
III. classification.....	10
1. Premier système de classification .....	10
a. Herbicides.....	10
b. Fongicides .....	10
c. Insecticides .....	10
2. Deuxième système de classification.....	11
IV. Toxicologie et écotoxicologie .....	13
1. Sur l'homme.....	13
2. Sur l'environnement .....	14
V. Les pesticides dans l'eau.....	15
1. Transfert des pesticides .....	15
2. Etat de contamination.....	15
VI. Le Marché des Pesticides .....	16
1. Dans le Monde.....	16
2. Au Maroc.....	16
VII. Règlementation.....	17
VIII. Carbofurane .....	18
1. Description.....	18
2. Propriétés physicochimique .....	18
3. la synthèse chimique du carbofurane.....	19
a. Description du procédé.....	19
b. Etapes de synthèse .....	19
4. Mécanisme d'action .....	21
a. L'Acétylcholinestérase .....	21
b. Mécanisme d'inhibition de l'acétylcholinestérase .....	21

5. Toxicocénitique.....	22
a. Absorption.....	22
b. Distribution .....	22
c. Métabolisme .....	23
d. Élimination.....	23
IX. Données toxicologiques de carbofurane .....	23
1. Toxicité aiguë.....	23
2. Toxicité chronique.....	23
a. Effets cancérigène, tératogène ou mutagène .....	23
b. Effets sur la reproduction et le développement .....	23
c. Comportement et devenir du carbofurane dans l'environnement.....	24
d. Effets sur les organismes non cibles .....	24
X. Réglementation.....	25

## PARTIE II : METHODES ANALYTIQUES

I. Introduction .....	28
II. Technique d'analyse : HPLC –UV.....	28
1. Principe .....	28
2. Appareillage .....	28
a. Un réservoir de solvant (éluant).....	28
b. Dispositif de dégazage .....	29
c. La pompe.....	29
d. Injecteur.....	30
e. Colonne .....	30
f. Détecteur .....	30
g. La phase stationnaire et la phase mobile .....	31
III. METHODES D'EXTRACTION ET D'ANALYSE.....	32
1. Matériels.....	32
<u>a.</u> Petit matériels .....	32
<u>b.</u> Appareillage .....	32
<u>c.</u> Réactifs.....	33
2. Méthodes d'échantillonnage.....	33
a. Collecte des échantillons de l'eau des puits .....	33
b. Collecte des échantillons d'eau d'extrémité : .....	33
c. Collecte des échantillons de sol .....	33
3. Traitement des échantillons .....	33
a. L'eau du puits .....	33
b. L'eau de surface.....	34
c. Le sol.....	34

## PARTIE III : VALIDATION DE LA METHODE D'ANALYSE ET DOSAGE DES ECHANTILLONS

I.	Introduction .....	36
II.	Contexte de la validation .....	36
1.	Définitions .....	36
2.	Critères .....	36
a.	Linéarité .....	36
b.	Limites de détection et de quantification.....	37
c.	Le ratio de conformité.....	37
d.	Fidélité.....	38
e.	Justesse.....	39
III.	Résultats et discussions.....	40
A.	Conditions d'analyses .....	40
1.	Principe de la méthode .....	40
2.	Produits chimiques et réactifs .....	40
3.	Instrumentation et conditions chromatographiques .....	40
a.	Appareillage .....	40
b.	Condition d'analyse .....	40
4.	Préparation des solutions standards du carbofurane .....	41
5.	Validation de la méthode.....	41
B.	Validation de la méthode d'analyse .....	41
1.	Linéarité .....	41
2.	La limite de détection, de quantification et le ratio de conformité .....	42
3.	Fidélité .....	43
a.	Répliquabilité.....	43
b.	Répitabilité .....	44
c.	Reproductibilité .....	44
4.	Justesse.....	45
C.	Dosage des résidus du carbofurane.....	45
1.	Objectif.....	45
2.	Propriétés physico-chimiques .....	45
3.	Dosage du carbofurane dans l'eau du puits .....	46
4.	Dosage du carbofurane dans l'eau d'extrémités .....	47
5.	Dosage du carbofurane dans le sol.....	48
	CONCLUSION GENERALE.....	49
	<b>BIBLIOGRAPHIE :</b> .....	<b>50</b>
	<b>ANNEXE I</b> .....	<b>52</b>
	<b>ANNEXE II</b> .....	<b>53</b>

## INTRODUCTION

La propagation d'industrialisation, la naissance de nouvelles technologies, l'accroissement de la population, le développement de l'agriculture et l'obligation de Maroc à améliorer sa production agricole dans le but de résoudre les problèmes de nutrition, sont tous liés à la consommation des quantités économes de pesticides.

Les pesticides aussi appelés produits phytosanitaires sont des substances émises dans les cultures pour lutter contre des organismes nuisibles. La lutte chimique existe depuis des millénaires et les pesticides sont utilisés depuis la deuxième guerre mondiale. Leur rôle est important en termes d'assurance des récoltes, de production du lait et de la viande, de la réduction du pourrissement des aliments stockés, la suppression d'épidémies, l'amélioration de l'hygiène corporelle, la réduction du personnel dans l'agriculture et la désinfections des lieux sanitaires.

Bien que l'objectif principal de l'utilisation de ces substances soit de résoudre certains problèmes, cette utilisation intensive peut être à l'origine d'autres problèmes et effets néfastes sur la santé humaine comme sur l'environnement. Les pesticides sont parmi les polluants les plus dangereux de l'environnement en raison de leurs stabilités, leurs mobilités, et les effets à long terme sur les organismes vivants. Le devenir des pesticides concerne tout le milieu naturel dans son ensemble (sol, eau et air) mais le sol reste un compartiment clé car une grande proportion des pesticides appliqués lors du traitement des cultures arrive au sol, par application directe et/ou par lessivage du feuillage. (1)

Dans l'agriculture moderne, le carbofuran est utilisé à large spectre d'activité en traitement du sol contre une large gamme d'insectes et ravageurs sur plusieurs cultures (légumières, maïs, soja, tournesol, arbres, arbustes d'ornement, cultures florales...). En conséquence, il a attiré une grande attention comme une alternative aux insecticides organochlorés, très persistants et très toxiques.

Bien qu'il est moins toxique et moins persistant que les organophosphorés (modérément persistants), le carbofurane présente une préoccupation internationale et est devenu une menace aussi bien pour la santé humaine et animal que pour l'environnement suite à sa détection dans des eaux superficielles et souterraines à cause de sa mobilité et de son lessivage dans beaucoup de sols. A cause de cette menace, son utilisation sous formes de granules est interdite aux USA depuis 1991 et au Canada à partir de 1993.

De nombreux travaux ont démontré la présence et la persistance du carbofuran dans les eaux, les sols, l'air mais aussi dans les produits alimentaires. Certains pesticides sont désormais considérés comme des polluants organiques persistants ou encore des perturbateurs endocriniens. Ils constituent à la fois une menace écologique et environnementale certaine mais également sanitaire. Afin de garantir la sécurité alimentaire des consommateurs et de préserver l'environnement, une législation concernant l'utilisation de ces composés a été mise en place. Dans de nombreux pays, celle-ci se traduit par une tolérance des résidus de ces micropolluants sous un certain seuil maximal (limite maximale de résidus). Il est alors aisé de comprendre pourquoi la problématique réside désormais dans la détermination et la quantification de ces pesticides dans différents milieux.

De nombreux programmes de suivi des résidus de pesticides dans des matrices alimentaires et des échantillons environnementaux ont déjà été menés. Cependant, le nombre de polluants à l'état de traces, qui doivent être suivis, est constamment croissant et les niveaux auxquels ces composés doivent être déterminés sont de plus en plus bas. Il est alors devenu nécessaire de développer des méthodes analytiques capables de détecter et de quantifier ces molécules à de très faibles teneurs.

## **OBJECTIF :**

Notre objectif est sert à mettre en place et valider une méthode de dosage des résidus du carbofurane présent dans des échantillons de l'eau et du sol prélevés à partir d'une terre agricole intégrer dans la région de Rabat - Salé - Kénitra .

Ce travaille est repartie en trois chapitres :

**Chapitre I :** Synthèse bibliographique relative au sujet des pesticides notamment le carbofurane.

**Chapitre II :** Techniques /Méthodes d'analyses utilisées pour l'extraction du carbofuran.

**Chapitre III :** Optimisation et validation d'une méthode de dosage du carbofurane .

**PRESENTATION**

**DU**

**CNESTEN**

## I. Présentation du CNESTEN

Le Centre National de l'Energie, des Sciences et des Techniques Nucléaires (CNESTEN) est un établissement public créé en 1986, à vocation scientifique, technique et commerciale et ouvrant sous la tutelle du Ministre de l'énergie, des Mines, de l'eau et de l'environnement, et administré par un conseil d'Administration présidé par le Premier Ministre.

### 1) Mise en service du Centre d'Etudes Nucléaires de la Maâmora

A partir de Janvier 2003, le CNESTEN a transféré ses activités de Rabat au CENM et a commencé l'exploitation des diverses installations et laboratoires. En effet, pour accompagner le développement de la demande nationale en matière des applications des techniques nucléaires, stimuler la recherche dans ce domaine et préparer l'avènement de l'électronucléaire pour des fins énergétiques ou de dessalement de l'eau de mer, le CNESTEN a réalisé, de 1999 à fin 2002, le premier centre d'études nucléaires du Maroc (CENM).

Cette œuvre scientifique et technique concrétise le choix politique et stratégique des pouvoirs publics marocains dans le domaine des hautes technologies.

Sa réalisation a pu voir le jour grâce à l'investissement consenti par l'Etat et à la coopération scientifique, technologique et financière de l'AIEA, la France et les Etats Unis d'Amérique.

### 2) Situation géographique

Le Centre National de l'Energie, des Sciences et des Techniques Nucléaires « CNESTEN » se situe en plein cœur de la forêt de la Maâmora, à 22 Km au Nord-est de Rabat et à 15 km au Sud-ouest de Kenitra., le Centre d'Etudes Nucléaires de la Maâmora (CENM) assure au Maroc la maîtrise du savoir-faire de la technologie nucléaire.



Le CENM est un complexe scientifique et technologique réalisé sur une superficie de 25ha la surface totale construite est de 18.300 m<sup>2</sup> abritant :

- ✚ Un réacteur nucléaire de recherche d'une puissance de 2 MW,

- ✚ Un ensemble de laboratoires de recherche scientifique et appliquée spécialisés dans les domaines :
  - des applications nucléaires en médecine, biologie et santé ;
  - de l'instrumentation et les applications industrielles des rayonnements ionisants
  - des applications nucléaires dans les sciences de la terre et de l'environnement
  - de la sûreté et la sécurité radiologique ;
  - de la gestion des déchets radioactifs;
- ✚ Un centre de Formation;
- ✚ Un Centre d'Information & de Documentation;
- ✚ Bâtiments conventionnels de support: Administration, Sécurité, moyens généraux, Cantine, Portier, Gendarmerie;
- ✚ Ateliers Mécaniques et Verrerie;
- ✚ Zones d'extension future.

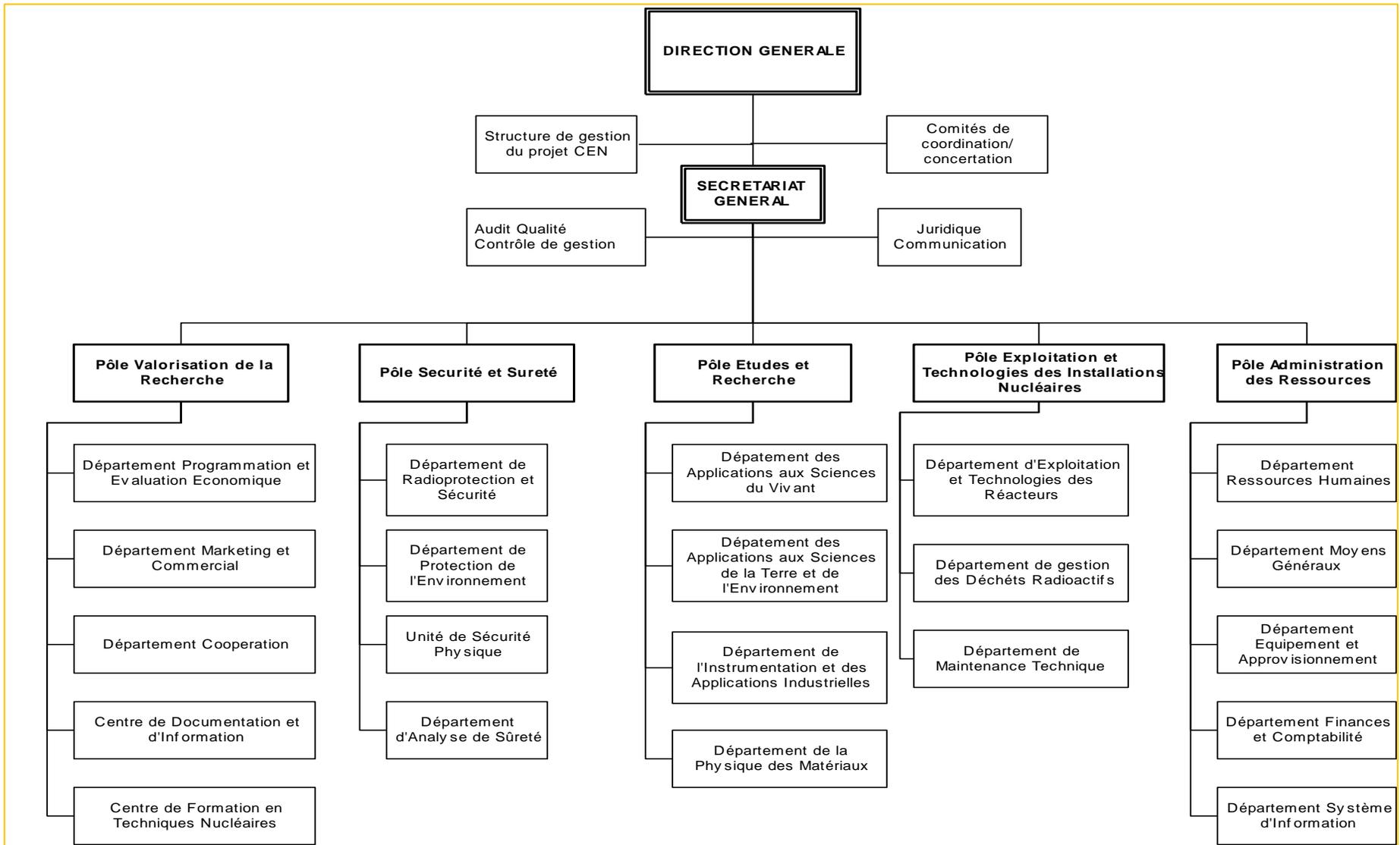
### 3) Missions principales du CNESTEN

- ✚ Développer la recherche scientifique dans le domaine nucléaire ;
- ✚ Promouvoir les applications des techniques nucléaires dans les secteurs socio-économiques ;
- ✚ Assurer le support technique à l'état en matière de sécurité radiologique et nucléaire ;
- ✚ Contribuer à la préparation des bases technologiques nécessaires à l'introduction de l'option électronucléaires.

Le CNESTEN s'est forgé une triple vocation: centre de recherche, de conseil et d'appui technique à l'état en matière nucléaire et prestataire de service dans le domaine des sciences et des technologies nucléaires.

Le CNESTEN a développé un savoir-faire et une expérience confirmés au niveau national et international dans le domaine de l'utilisation des techniques nucléaires dans les secteurs de la santé, l'eau, l'environnement, l'agriculture, l'industrie, l'énergie, la sûreté et la sécurité.

## II. Organigramme générale du CNESTEN



*Organigramme Général du CNESTEN*

# Chapitre I

## **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## I. Introduction

La première utilisation des pesticides en agriculture date de l'antiquité. Leur développement à ensuite suivi celui de la chimie minérale. Les composés alors employés étaient des dérivés de composés minéraux ou de plantes comme par exemple, ceux à base d'arsenic, de cuivre, de zinc, de manganèse ou de sulfate de nicotine. Puis, à partir de la seconde guerre mondiale, les pesticides ont bénéficié du développement de la chimie organique. Les composés synthétiques majoritaires ont d'ailleurs été à l'origine de l'expansion rapide des produits phytosanitaires à partir des années 1940.

(2)

	HERBICIDES	FONGICIDES	INSECTICIDES
Avant 1900	Sulfate de cuivre Sulfate de fer	Soufre Sels de cuivre	Nicotine
1900 - 1920	Acide sulfurique		Sels d'Arsenic
1920 - 1940	Colorants nitrés		
1940 - 1950	Phytohormones...		Organo-chlorés Organo-phosphorés
1950 - 1960	Triazines, Urées substituées Carbamates	Dithiocarbamates Phtalimides	Carbamates
1960 - 1970	Bipyridyles, Toluidines...	Benzimidazoles	
1970 - 1980	Amino-phosphonates Propionates...	Triazoles Dicarboximides Amides, Phosphites Morpholines	Pyréthrinoides Benzoylurées (régulateurs de croissance)
1980 - 1990	Sulfonylurées...		
1990 - 2000		Phénylpyrroles Strobilurines	Néonicotinoïdes

**Tableau 1 :** Historique de l'évolution des trois plus grandes classes de pesticides des années 1900 à nos jours (3).

Plus de 1000 pesticides sont utilisés à travers le monde pour empêcher que nos aliments ne soient endommagés ou détruits par des nuisibles. Chacun de ces pesticides possède des propriétés et des effets toxicologiques différents.

Bien que la plupart d'entre eux aient été interdits dans de nombreux pays en raison d'effets mutagènes et cancérigènes, les pesticides et leurs métabolites sont toujours présents dans l'environnement, en particulier dans les sols et les sédiments, en raison de leur persistance et leurs propriétés lipophiles (4).

## II. Présentation générale des pesticides

### 1. Définitions

#### a. Pesticides

Les pesticides sont, en terme générique utilisé pour désigner toutes les substances naturelles ou de synthèse capables de contrôler, d'attirer, de repousser, de détruire ou de s'opposer au développement des organismes vivants (microbes, animaux ou végétaux) considérés comme indésirables pour l'agriculture, l'hygiène publique (par exemple les cafards dans les habitations), la santé publique (les insectes parasites (poux, puces) ou vecteurs de maladies telles que le paludisme et les bactéries pathogènes de l'eau détruites par la chloration, la santé vétérinaire, ou les surfaces non-agricoles (routes, aéroports, voies ferrées, réseaux électriques...), ils sont l'un des rares substances qui sont à la fois toxiques et délibérément rejetés dans l'environnement (5).

#### b. Résidu de pesticides

Selon la FAO (Food and Agriculture Organization), un résidu de pesticides désigne toute substance présente dans les aliments, les produits agricoles ou les aliments fourragers par suite de l'utilisation d'un pesticide. Ce terme englobe tous les dérivés du pesticide comme les métabolites, les produits de dégradation, les impuretés possédant des propriétés toxicologiques avérées.

### 2. Compositions

Un pesticide comprend une ou plus des matières actives et des matières additives. La présentation sous laquelle un pesticide est vendu et utilisé est appelée « formulation ».

La formulation est composée de deux types de matières :

- **Les matières actives** sont responsables de l'effet et de la toxicité intrinsèque d'un pesticide.
- **Les matières additives** permettent l'utilisation de la formulation, assurent la stabilité des matières actives durant le stockage et/ou l'utilisation.

Les matières additives sont souvent appelées des adjuvants, des solvants, ou des excipients (6).

### III. classification

Les pesticides disponibles aujourd'hui sur le marché sont caractérisés par une telle variété de structures chimiques, de groupes fonctionnels et d'activités que leur classification est complexe.

En général les substances actives sont classées en fonction de :

- la nature de l'espèce à combattre (premier système de classification),
- la nature chimique de la principale substance active (deuxième système de classification (7,8)).

#### 1. Premier système de classification

Le premier système de classification repose sur le type de parasites à contrôler.

Il existe principalement trois grandes familles d'activités que sont les :

- Herbicides
- Fongicides
- Insecticides

##### a. Herbicides

Ce sont les plus utilisés dans le monde en tonnage et en surface. Ils sont destinés à éliminer les végétaux rentrant en concurrence avec les plantes à protéger en ralentissement leur croissance. Ils peuvent être des perturbateurs de la régulation d'une hormone «l'auxine», le principale hormone agissant sur l'augmentation de la taille des cellules, de la photosynthèse ou encore des inhibiteurs de la division cellulaire, de la synthèse des lipides, de cellulose ou des acides amines.

##### b. Fongicides

Ces substances permettent de combattre la prolifération des maladies des plantes provoquées par les champignons ou encore des bactéries.

Ils peuvent agir différemment sur les plantes soit en inhibant le système respiratoire ou la division cellulaire, soit en perturbant la biosynthèse des acides aminés, des protéines ou le métabolisme des glucides.

##### c. Insecticides

Ces substances sont utilisées pour la protection des plantes contre les insectes. Ils interviennent en les éliminant ou en empêchant leur reproduction.

Ils existent différents types d'insecticides tels que les neurotoxiques, les régulateurs de croissance et ceux agissant sur la respiration cellulaire.

Outre, ces trois grandes familles, d'autres peuvent être citées en exemple :

- les **taupicides** contre les taupes,
- les **acaricides** contre les acariens,
- les **rodenticides** contre les rongeurs,
- les **nématocides** contre les nématodes et les vers,
- les **molluscicides** contre les mollusques, limaces et escargots,
- les **corvicides** contre les corbeaux et tous les oiseaux ravageurs de cultures.

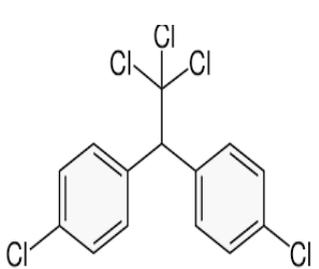
## 2. Deuxième système de classification

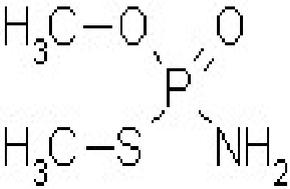
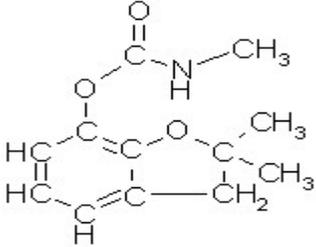
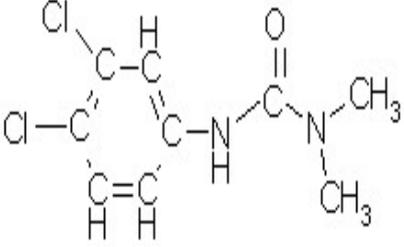
Le classement se fait en fonction de la nature chimique de la substance active.

Les principaux groupes chimiques comprennent les :

- Organochlorés
- Organophosphorés
- Carbamates
- Pyréthrinoïdes

À ceux-ci s'ajoutent des produits divers tels que les triazines et les urées substituées.

Famille de molécules	Définition	Exemples
<p style="text-align: center;"><b>Les Organochlorés</b></p>	<p>Les organochlorés sont des insecticides composés d'atomes de carbone, d'hydrogène et de chlore.</p> <p>Ce sont des composés apolaires donc très peu solubles dans l'eau, fortement solubles dans les lipides et les solvants organiques. Ils sont caractérisés par leur résistance à la dégradation biologique, chimique et photolytique, par leur toxicité et par leur tendance à la bioaccumulation dans la chaîne alimentaire. (9)</p>	<p>Dichlorodiphényltrichloroéthane</p> 

<p style="text-align: center;"><b>Les Organophosphorés</b></p>	<p>Les organophosphorés sont des composés chimiques similaires aux organochlorés caractérisés par la présence d'un atome de phosphore.</p> <p>Ils constituent la classe des insecticides la plus toxique pour les vertébrés cependant ils sont peu persistants dans l'environnement et se dégradent rapidement en climat tropical. Ce qui justifie leur présence en agriculture comparativement aux organochlorés (10).</p> <p>Ils sont généralement subdivisés en trois groupes suivants les structures : les aliphatiques, les dérivés phénylés et les hétérocycles.</p> <p>Ils sont généralement volatiles et solubles dans les hydrocarbures non aliphatiques et sont susceptibles de s'hydrolyser facilement en milieu alcalin.</p>	<p style="text-align: center;">Méthamidophos</p> 
<p style="text-align: center;"><b>Les Carbamates</b></p>	<p>Les carbamates sont des insecticides dérivés de l'acide carbamique, qui agissent en inhibant l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase, inhibition qui peut être réversible dans certains cas.</p>	<p style="text-align: center;">Carbofurane</p> 
<p style="text-align: center;"><b>Les pyréthrinoïdes</b></p>	<p>Les pyréthrinoïdes sont des insecticides synthétiques. Leur structure est dérivée des pyréthrines, issues des fleurs du pyrèthre. Ils sont stables à la lumière et sont en général efficaces à faible dose sur un large spectre d'insectes(9).</p>	<p style="text-align: center;">Diuron</p> 

**TABLEAU 2 :** Les principaux groupes chimiques des pesticides.

## IV. Toxicologie et écotoxicologie

Plusieurs études ont été menées pour connaître le devenir des produits phytosanitaires après leur épandage en zone agricole. Les résultats obtenus ont permis de conclure que le recours excessif aux pesticides peut porter préjudice à la santé des agriculteurs et des consommateurs, tout comme à l'environnement et à l'économie.

### 1. Sur l'homme

La contamination de l'homme par les pesticides peut se faire par différentes voies. Il peut les absorber via les aliments et l'eau ou par contact avec la peau ou encore par inhalation.

A l'inverse, d'autres substances de toxicité moindre sont susceptibles de s'accumuler dans l'organisme et d'induire des effets à plus long terme qui sont difficilement quantifiables.

Par ailleurs ces produits sont transformés parallèlement en différents métabolites susceptibles d'engendrer d'autres répercussions sur l'organisme humain (10).

Plusieurs études épidémiologiques ont établi des liens plus ou moins importants entre l'exposition professionnelle aux pesticides et certaines formes de cancers (11).

Des relations ont été observées pour le lymphome non hodgkinien (cancer des lymphocytes), la leucémie, les sarcomes, le myélome multiple, le cancer du cerveau et le cancer de la prostate. Des possibilités d'association ont aussi été faites pour le cancer du sein, du poumon, du pancréas, de la vessie, des testicules et de l'estomac (12).

A noter aussi que des pesticides ont été retrouvés dans le cordon ombilical mais aussi dans le lait maternel. Ils sont à l'origine parfois des mauvais développements des fœtus, des malformations congénitales et des anomalies du système nerveux central (13).

Certaines substances de synthèse, dont des pesticides, peuvent perturber le système hormonal ou endocrinien et provoquer un déséquilibre physiologique, pourraient aussi être associées au développement du cancer du sein, à une réduction de la fertilité mâle, à des dommages aux glandes thyroïde et pituitaire, à la diminution du système immunitaire et à des problèmes liés au comportement. Parmi les autres effets possibles chez l'humain, on peut noter l'obésité, la décalcification des os et le diabète (14).

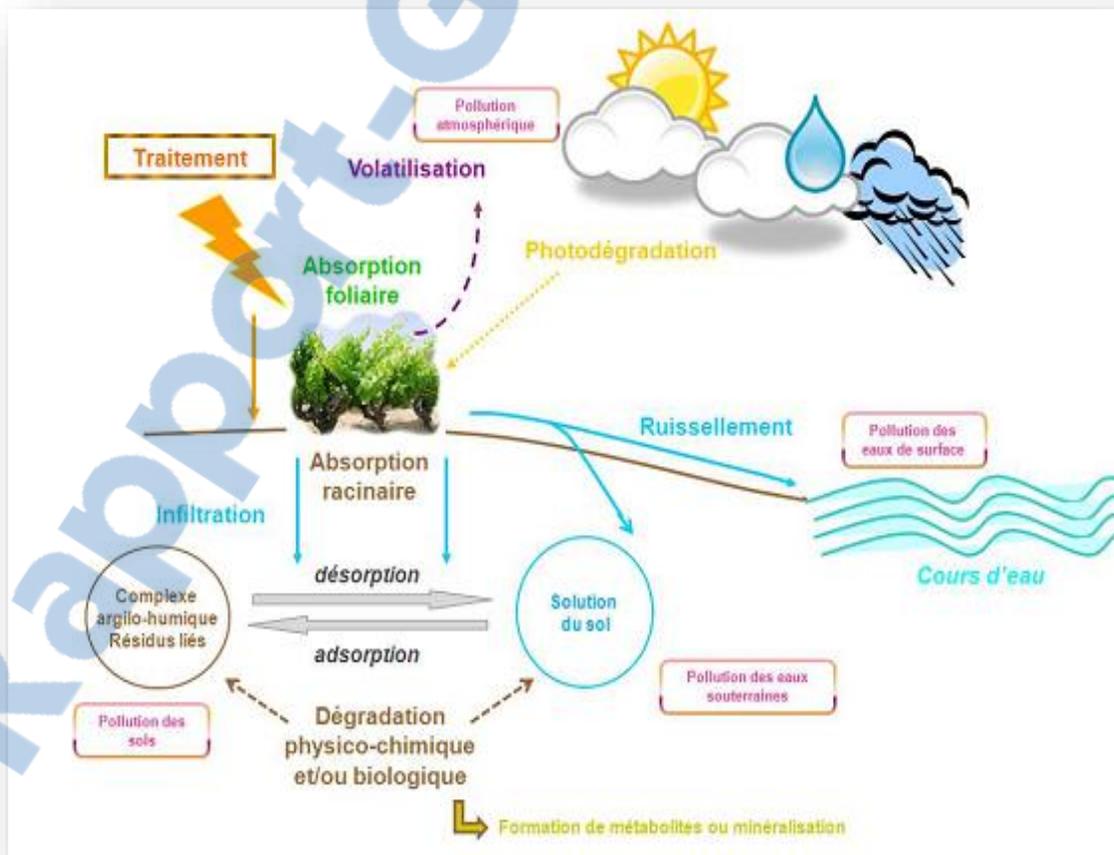
Mais tous ces liens entre les produits phytosanitaires et certains cancers ne sont que des suppositions. Il n'est pas exclu que d'autres facteurs de risque présents en milieu agricole (comme le tabagisme, le rayonnement solaire, l'alimentation...) puissent jouer un rôle important dans le déclenchement de ces cancers (15).

## 2. Sur l'environnement

Les substances actives phytosanitaires sont appliquées le plus souvent sous la forme de liquides pulvérisés sur les plantes et/ou sur le sol. Dans certains cas, elles sont incorporées au sol, déposées sous forme de granulés, ou encore par le biais des graines qui en sont enrobées.

Dès qu'ils ont atteint le sol ou la plante, les pesticides peuvent être absorbés par les plantes ou des organismes du sol, les substances actives peuvent se volatiliser, ruisseler ou être lessivées, voire même rester dans le sol.

Ainsi, l'ensemble des compartiments environnementaux peuvent être potentiellement touché et impacté par les pesticides, en plus des cibles contre lesquelles ils sont théoriquement dirigés. Les effets toxiques indésirables pour les espèces non cibles des trois compartiments environnementaux sont liés et il est illusoire de vouloir les distinguer. En effet une même substance active pourra avoir des répercussions sur l'ensemble des espèces constitutives des différents compartiments de l'environnement. (16)



**FIGURE 1:** Mécanismes de transferts et de transformations des pesticides dans les milieux de l'environnement.

## V. Les pesticides dans l'eau

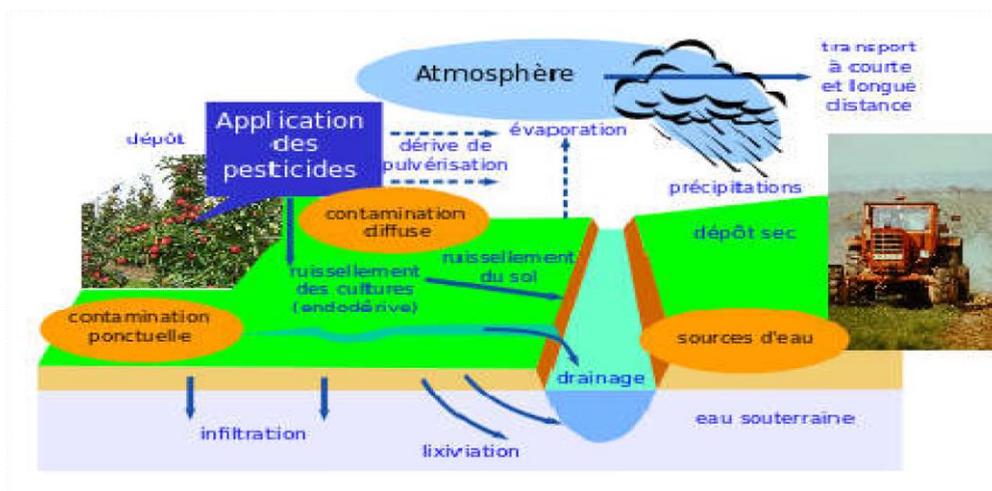
### 1. Transfert des pesticides

L'eau est un des vecteurs principaux du transfert des substances phytosanitaires appliquées sur les parcelles vers les milieux aquatiques. Par conséquent, la caractérisation des voies de transfert de l'eau est indispensable à la mise en place de moyens pour limiter les risques de transferts associés de matières actives. L'eau excédentaire est susceptible de mobiliser et faire migrer les produits phytosanitaires vers les ressources en eau par infiltration, ruissellement ou écoulement hypodermique. En règle générale, l'infiltration est supposée alimenter les réserves souterraines, tandis que le ruissellement et l'écoulement hypodermique orientent l'eau vers les réseaux superficiels. A ces trois voies de circulation s'ajoute le transfert par réseau de drainage.

### 2. Etat de contamination

La problématique des pesticides comme polluants concentrés et entraînés par les eaux de pluie et de ruissellement vers les cours d'eau et les nappes phréatiques est approfondies car les conséquences peuvent être majeures à la fois sur la santé de l'homme mais également sur la faune et la flore en provoquant des déséquilibres et des accumulations de toxiques tout le long de la chaîne alimentaire.(17)

Le risque de contamination quasi directe des nappes lié à un apport accidentel, le transfert par infiltration des produits phytosanitaires épandus sur les champs agricoles peuvent aussi entraîner la contamination des eaux souterraines. Dans ce cas là, le risque de contamination dépend de la mobilité du pesticide elle-même fonction de leur propriétés physico-chimiques, des propriétés du sol et de la vitesse d'infiltration dans le sol . Des études a été effectuer pour examiner le niveau de contamination en pesticides des eaux souterraines en Lorraine. Ils ont dénombré 5 matières actives fréquemment retrouvées dans ce milieu : atrazine, simazine, lindane, carbofurane et isoproturon. (18)



**FIGURE 2 :** Processus de pollution environnementale par les pesticides.

## VI. Le Marché des Pesticides

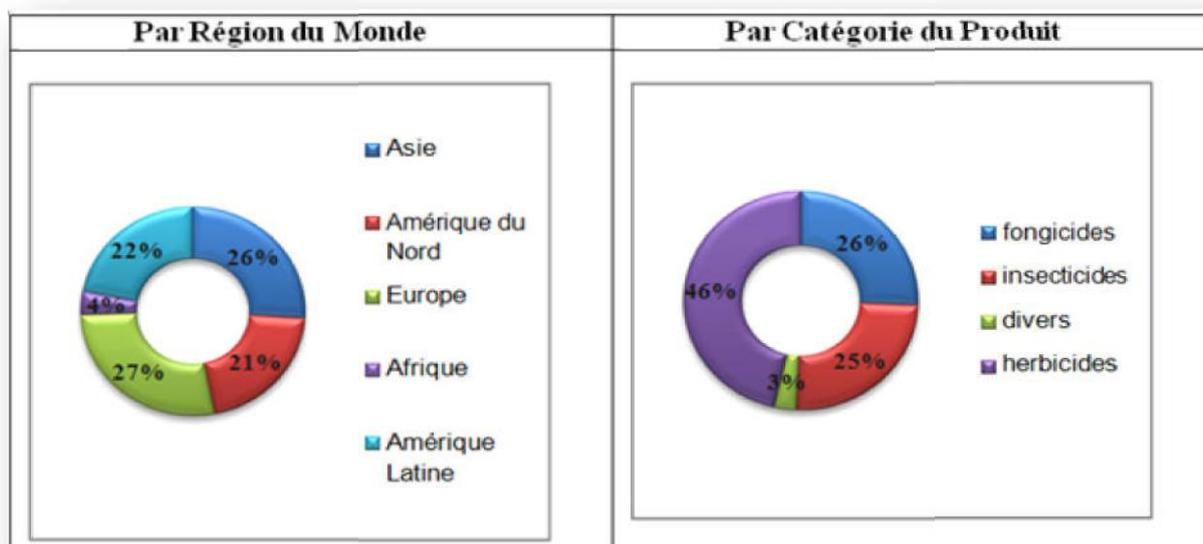
### 1. Dans le Monde

Il existe dans le Monde près de 100 000 spécialités commerciales autorisées à la vente. Elles sont composées à partir de 900 matières actives différentes. On enregistre 15 à 20 nouvelles matières actives qui s'y rajoutent chaque année.

Le marché mondial (environ 40 milliards de dollars) est globalement stable depuis quelques années (2000).

Il faut noter que certains évènements climatiques récents (chaleur et sécheresse en Europe, pluie en Océanie) influencent fortement ces chiffres, en Europe et en Amérique du Nord. Les herbicides représentent 70 à 80% des produits utilisés (notamment à cause de la forte augmentation des cultures de maïs) tandis que sous les Tropiques, 50% des produits appliqués sont des insecticides.

La diversification des cultures, avec l'amélioration du niveau de vie dans certains pays, modifie également cet équilibre. Ainsi la Chine a converti l'équivalent de la surface de l'Angleterre de rizières en cultures maraîchères, entraînant une diversification des produits mis en œuvre (19).



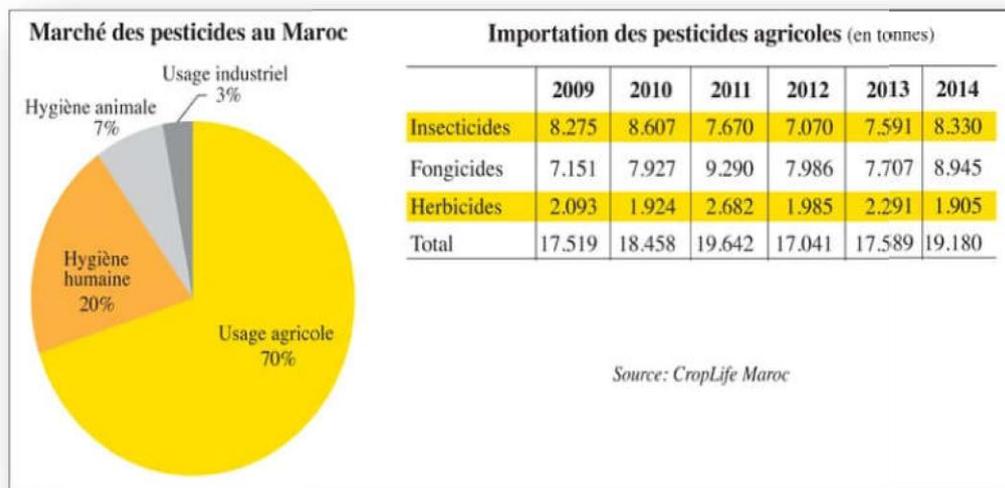
**SECTEUR 1** : L'utilisation des pesticides dans le monde par région et par catégorie (19)

### 2. Au Maroc

Le Maroc importe chaque année entre 6.000 à 6.500 tonnes de produit phytosanitaires par le biais d'environ 28 sociétés. Il existe actuellement sur le marché, environ 210 matières actives représentées par 1400 spécialités commerciales.

Les insecticides occupent la première place avec près de 90 molécules et 602 spécialités commerciales. Ensuite viennent les fongicides avec 40 molécules (380 spécialités), les herbicides avec 60 molécules (192 spécialités).

Enfin, 18 molécules de pesticides divers (acaricides, acaricides, auxines, etc...) représentés par 255 spécialités commerciales ont été homologués. (20)(21)



**SECTEUR 2:** Quantité des pesticides importés au Maroc en tonnes de 2009 à 2014 (source : CropLife Maroc).

## VII. Règlementation

Le contrôle des produits phytosanitaires s'est établi peu à peu en fonction de la politique de développement prônée par le pays et par la disponibilité des moyens.

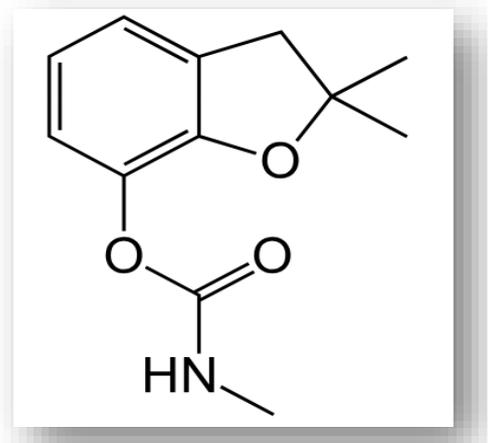
Au Maroc, ce contrôle a connu une évolution dans le temps. La promulgation de la Loi n°42-95 relative au contrôle et à l'organisation du commerce des produits pesticides à usage agricole a permis d'édicter les mesures relatives à la fabrication, l'étiquetage, l'entreposage, la distribution, la commercialisation et l'utilisation des produits phytosanitaires à usage agricole. Au terme de la loi, aucun produit phytosanitaire ne peut être commercialisé, importé ou fabriqué s'il n'a pas fait l'objet d'une homologation (22).

## VIII. Carbofurane

Le carbofurane, un carbamate anticholinestérase, est couramment utilisé comme insecticide, nématocide et acaricide dans les pratiques agricoles du monde entier. En raison de son utilisation répandue dans l'agriculture, la contamination des aliments, de l'eau et de l'air est devenue imminente et, par conséquent, des effets néfastes sur la santé sont inévitables chez les humains, les animaux, les espèces sauvages et les poissons. Actuellement, le carbofuran est le plus souvent impliqué dans une intoxication malveillante.

### 1. Description

Le carbofurane ou le 3,3-dihydro-2,2-diméthylbenzofuran-7-ylméthylcarbamate de formule brute (C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>) est un insecticide et un nématocide du groupe des carbamates, solide et cristallin, stable en milieu neutre ou acide, mais instable en milieu alcalin, utilisé dans la lutte contre une grande variété d'organismes défoliateurs et fousseurs qui s'attaquent à de nombreuses cultures de fruits et de légumes.



### 2. Propriétés physicochimique

Carbofurane	Propriété	Unité	Valeur
 <b>Formule brute</b> : C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub> <b>Nature</b> : Insecticide <b>Apparence</b> : Cristaux blancs <b>Utilisation</b> : Toutes les cultures	Masse molaire	g mol <sup>-1</sup>	221,30
	Point de fusion	°C	153–154
	Pression de vapeur	mPa	2,7
	Densité	g/cm <sup>3</sup>	1,8
	Dégradation	jours	30–117
	Solubilité dans l'eau	mg/litre	700
	DT <sub>50</sub> <sup>1</sup>	(Jour)	26 à 110 dans le sol 690 dans l'eau
	DL <sub>50</sub> <sup>2</sup>	(mg Kg <sup>-1</sup> )	2 chez les souris

**TABLEAU 3:** Propriétés physico-chimiques et données de toxicité du carbofurane (23).

<sup>1</sup>**DT50** : le temps de demi-vie dans un milieu donné, est la période nécessaire à la disparition de la moitié du produit appliqué (en jours).

<sup>2</sup>**DL50** : La dose létale 50 (concentration létale 50) est un indicateur quantitatif de la toxicité d'une substance.

### 3. la synthèse chimique du carbofurane

Le carbofurane est synthétisé par plusieurs méthodes, nous citons le procédé de synthèse

à partir le 1,2 cyclohexanedion :

#### a. Description du procédé

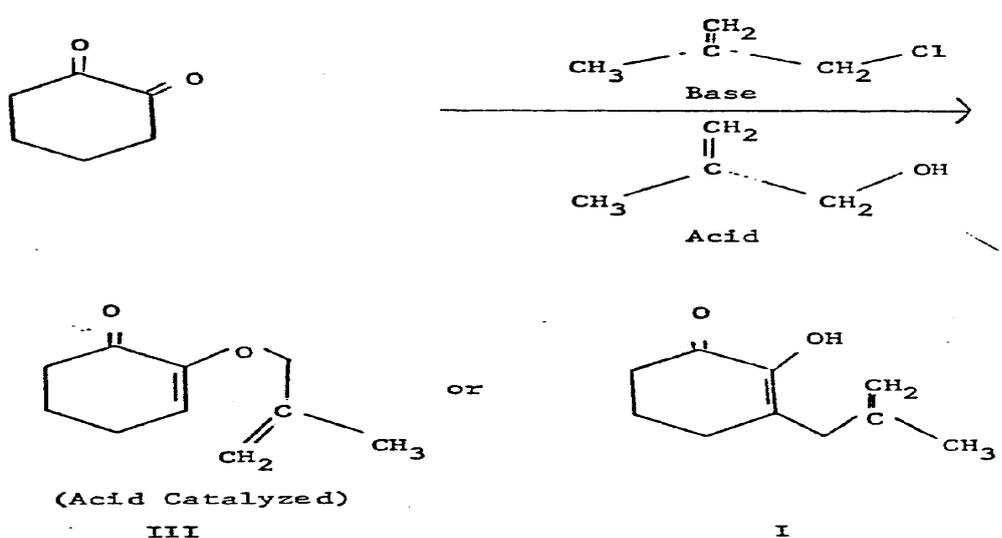
Le procédé comprend l'alkylation de la 1,2-cyclohexanedione avec un composé bêta-méthallylique et la soumission du produit résultant à un réarrangement / axomatisation de Claisen pour obtenir du carbofurane phénol.

En fin la réaction du phénol avec l'isocyanate de méthyle donne le carbofurane.(24)

#### b. Etapes de synthèse

Ce processus peut être décrit comme suit :

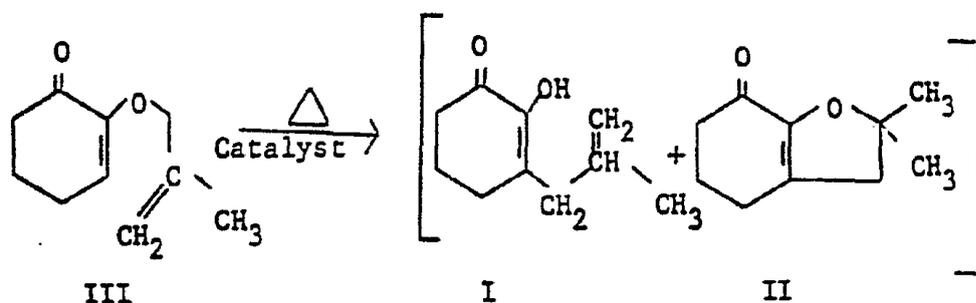
##### + l'alkylation de la 1,2-cyclohexanedione :



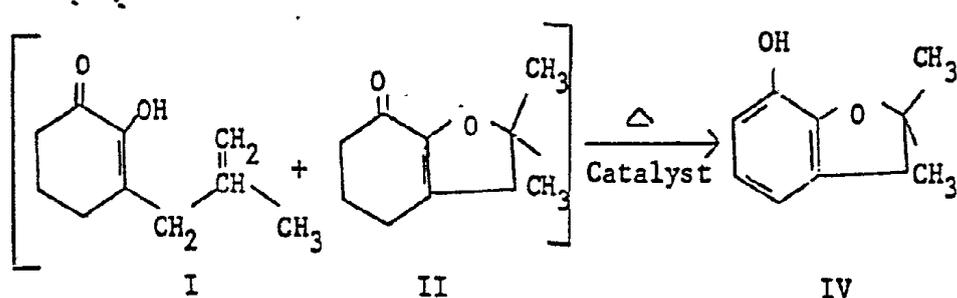
Dans la voie préférée, la 1,2-cyclohexanedione est O- et C-alkylée avec du chlorure de bêta-méthallyle par catalyse basique ou O-alkylée avec de l'alcool bêta-méthallylique par catalyse acide pour donner le bêta-méthallyldiosphénol III correspondant.

### ✚ Formation du carbofuranol :

Le réarrangement de disophénol III en 1,2-dione I substituée en 3 (indiquée en énol) ou en dérivé dihydrofurane II est réalisé.

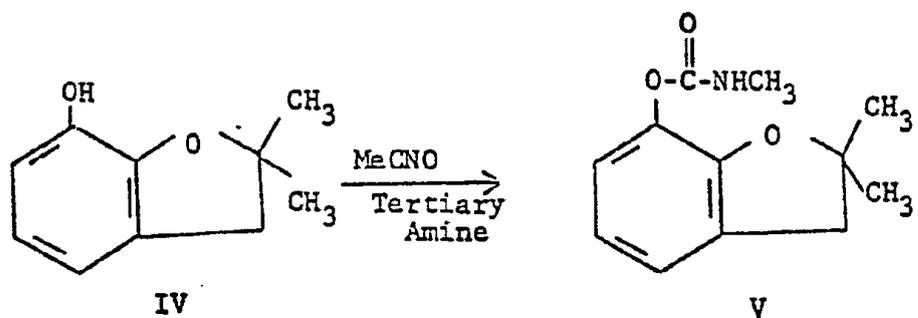


Ces intermédiaires ne sont pas isolés mais sont ensuite chauffés en présence d'un catalyseur d'aromatisation (tel que le palladium sur divers supports ou le soufre) pour donner le benzofuranol IV:



### ✚ Préparation du carbofurane :

Le benzofuranol IV est ensuite converti en carbofurane par des procédures classiques de carbamoylation, telles que par réaction avec de l'isocyanate de méthyle en présence d'un catalyseur à base d'amine tertiaire:



## 4. Mécanisme d'action

Le carbofurane est un insecticide à large spectre très toxique de la famille des carbamates. Il est absorbé à partir du tractus gastro-intestinal, par inhalation, et dans une moindre mesure par la peau intacte.

C'est un pesticide anticholinestérasique qu'il agit par inhibition réversible de l'acétylcholinestérase (Responsable de la dégradation de l'acétylcholine : neurotransmetteur du système parasympathique qui est libéré aux jonctions neuromusculaires) et qui provoque une crise cholinergique et en fin la mort des insectes.

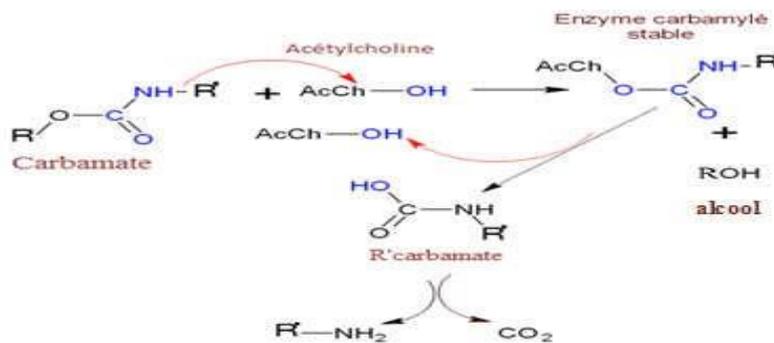
### a. L'Acétylcholinestérase

Est une enzyme qui catalyse la réaction d'hydrolyse de l'acétylcholine (médiateur chimique du système nerveux parasympathique nécessaire à la transmission de l'influx nerveux) en choline et en acide acétique.

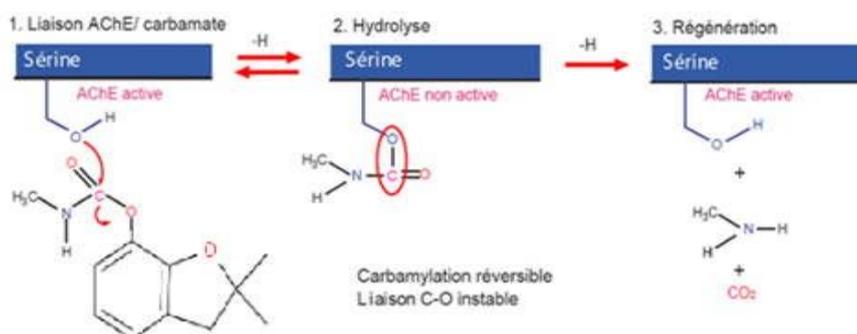
En physiologie, cette réaction est nécessaire pour permettre aux récepteurs cholinergiques de revenir à leur état de repos après activation.

### b. Mécanisme d'inhibition de l'acétylcholinestérase

Les carbamates en générale réagissent avec les estérases (acétylcholinestérase) qui sont rapidement hydrolysés, avec fixation du carbamate sur le site catalytique, donnant naissance à une enzyme carbamylée stable par rapport à l'enzyme acétylée formé naturellement.



**FIGURE 3 :** La réactivité des carbamate avec l'acétylcholine.



**FIGURE 4:** Mécanisme d'action toxique d'un carbamate (carbofurane). (25)

## 5. Toxicocénitique

Le carbofurane est dégradé dans le sol par hydrolyse, par action microbienne et, dans une moindre mesure, par photodécomposition. Sa persistance dépend du pH, du type de sol, de la température, de la teneur en eau et de la population microbienne.(26)

### a. Absorption

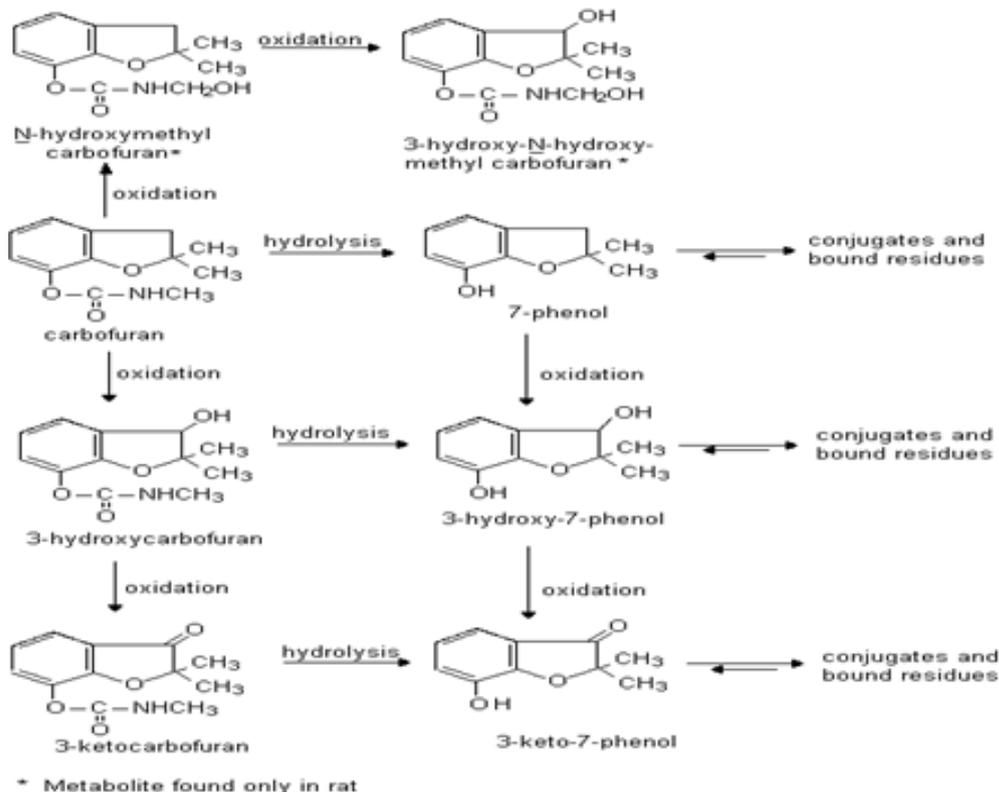
- Une absorption digestive rapide et quasi complète (>90%).
- Une bonne pénétration cutanée du fait de leur lipophilie importante.

### b. Distribution

La plupart des produits sont rapidement distribués dans l'organisme et ne tendent pas à s'accumuler. Les concentrations les plus élevées sont retrouvées dans les organes où le produit sera métabolisé.

### c. Métabolisme

Principalement hépatique, le carbofurane est dégradé en différents composés comprenant le carbofuranéphénol, le 3-hydroxycarbofurane et le 3- céto-carbofurane, le 3-hydroxycarbofuranéphénol et le 3-céto-carbofurane phénol.



**FIGURE 5** : Les différents métabolites de carbofurane (27).

#### d. Elimination

L'excrétion des métabolites est essentiellement urinaire, accessoirement pulmonaire et fécale.

Le carbofurane est donc rapidement absorbé, métabolisé et éliminé principalement via l'urine. L'hydroxylation, les réactions d'hydrolyse et de conjugaison sont les principales étapes métaboliques. Les métabolites résultants sont soit des esters, soit des produits de clivage de la liaison ester. (28)

## IX. Données toxicologiques de carbofurane

### 1. Toxicité aiguë

Le Carbofuran appartient à la classe Ib (très dangereux) de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé)(29). Certaines de ses formulations appartiennent à la classe I (très dangereux ou extrêmement dangereux) ou sont de la classe II (modérément dangereux). Il est extrêmement toxique par voie orale et par inhalation (la DL50 est 5 à 13 mg/kg chez le rat, 2mg/kg chez la souris).

La toxicité par la voie cutanée est faible. Il est peu irritant pour les yeux et la peau. Il n'est pas un sensibilisant cutané (32). La dégradation par la chaleur peut libérer des vapeurs toxiques (30). De tous les pesticides utilisés sur les cultures, excepté l'aldicarb et le parathion, le carbofuran a la plus forte toxicité aiguë chez l'homme (29).

C'est un neurotoxique dû à son activité d'inhibiteur de la cholinestérase (29) (30), (31). Cette activité est de courte durée et est réversible (30). Une personne exposée à des doses supérieures à 0,25 mg·kg<sup>-1</sup> du poids corporel peut présenter des symptômes tels que: salivation, douleurs abdominales, somnolence, étourdissement, anxiété, vomissement, perte de contrôle, voire coma et arrêt cardiaque (31).

C'est un puissant perturbateur endocrinien qui peut causer une altération de la concentration de plusieurs hormones de l'homme et de l'animal même à une dose infime. (31)

### 2. Toxicité chronique

#### a. Effets cancérigène, tératogène ou mutagène

Le carbofurane n'est pas connu pour induire des effets cancérigènes de même, il n'a pas été démontré que le carbofuran est tératogène ou mutagène (29).

#### b. Effets sur la reproduction et le développement

L'administration subchronique du carbofuran aux rats peut présenter une toxicité pour les spermatozoïdes et les testicules (32). L'exposition prolongée ou répétée au carbofuran peut causer les mêmes effets qu'une exposition aiguë (32). Il n'a pas été démontré que le carbofuran a un effet

sur la reproduction chez l'homme et l'animal au niveau d'exposition prévus (30). Cependant l'ingestion de doses élevées de manière chronique endommage les testicules chez les chiens (30). Les doses de 5mg/kg/jour données aux rats et aux souris pendant deux ans ont montré des diminutions de poids, le carbofurane est connu pour induire des effets sur la reproduction et le développement (29).

#### c. Comportement et devenir du carbofurane dans l'environnement

Le carbofuran est soluble dans l'eau, et est classé comme mobile à très mobile dans les sols sablonneux et limoneux, et modérément dans les sols argileux (30).

Au sol, sa demi-vie relative à la photolyse est de 78 jours. Il est très persistant dans les sols en condition aérobie. Sa demi-vie varie selon le pH du sol (demi-vie = 149 j à pH 7,7 et demivie = 321j à pH 5,7) (33). Le carbofuran se dégrade assez lentement dans les sols non stériles, neutres ou acides dans des conditions aérobies avec une demi-vie de 1 à 8 semaines. Il est plus stable dans un sol stérile et instable dans des conditions alcalines.

Dans des conditions anaérobiques, le carbofuran peut prendre deux fois plus de temps avant de se dégrader (34). Il est aussi très persistant dans l'eau en condition anaérobie où sa demi-vie est de 189 jours (33). Du fait de sa grande mobilité, le carbofuran présente un risque de contamination des eaux superficielles dans les zones sablonneuses, le carbofuran est connu pour lixivier dans le sol, et il a été trouvé dans des eaux souterraines suite à des utilisations agricoles (34).

Dans l'air, le carbofuran existe à la fois sous forme de vapeur et adsorbé sur les particules en suspension. (33)

#### d. Effets sur les organismes non cibles

Plusieurs sources concordantes existent sur la haute toxicité du carbofurane envers les oiseaux (30). Une seule graine peut tuer un oiseau (DL50<sup>1</sup> orale de 0,4 mg/kg poids corporel (33).

Le carbofuran est très toxique pour les invertébrés de l'eau douce et extrêmement toxique pour les oiseaux (34). Il est modérément à très toxique chez les poissons d'eau douce (CL50 96 h = 88 à 1 990 ppb) (33). Il est extrêmement toxique chez la Daphnie magna, la CL50<sup>2</sup> est de 0,015 mg/l, (20), chez les algues la DL 50 est de 19,9 mg/l (31).

Le carbofuran est extrêmement toxique chez les abeilles (34), avec une DL50 aiguë par contact de 0,16µg/abeille (33).

---

<sup>1</sup> **DL50** : Dose létale médiane

<sup>2</sup> **CL50** : Concentration létale médiane

## X. Règlements

L'analyse de EPA (Agence de Protection environnementale) a également confirmé que le carbofuran est une menace pour la santé humaine à travers la nourriture, l'eau et les boissons contaminées, et aussi l'exposition professionnelle (35).

L'EPA interdit toutes les utilisations du carbofuran, et cette décision a été appliquée le 31 décembre 2009. Le carbofuran ne peut pas être utilisé aux Etats-Unis, où il est produit (36).

Pays	Décisions
Union européenne	La Décision de la Commission 2007/416/CEdu 13 juin 2007 est pleinement entrée en vigueur le 13 décembre 2008, toute utilisation de produits phytopharmaceutiques contenant du carbofuran étant alors interdite à compter de cette date au plus tard. (37)
Canada	La vente de produits pesticides contenant du carbofuran a été interdite au Canada à compter du 31 décembre 2010. L'utilisation de produits pesticides contenant du carbofuran a été interdite à partir du 31 décembre 2012. Les produits pesticides contenant du carbofuran ne peuvent plus être utilisés au Canada. (37)
Pays du CILSS (Cabo Verde, Gambie, Mauritanie, Niger, Sénégal, Tchad et Togo)	Sur la recommandation du Comité sahélien des pesticides (CSP), le carbofuran a été interdit par la décision du Ministre coordonnateur du CILSS n° 008/MAE-MC/2015 du 08 avril 2015. Les produits à base de carbofuran ne peuvent plus être utilisés dans les pays du CILSS. (37)
Maroc	Selon la décision du Ministre de l'Agriculture du Développement Rural et des Pêches Maritimes le carbofuran a été homologué pour usage agricole dans les cultures de tomate et de betterave à sucre pour une durée de dix ans durant la période du 17/04/2006 au 16/04/2016. La même décision est encore disponible dans le marché des pesticides jusqu'à présent. (Annexe I).

**TABLEAU 4 :** La réglementation finale relative à l'utilisation de carbofuran.

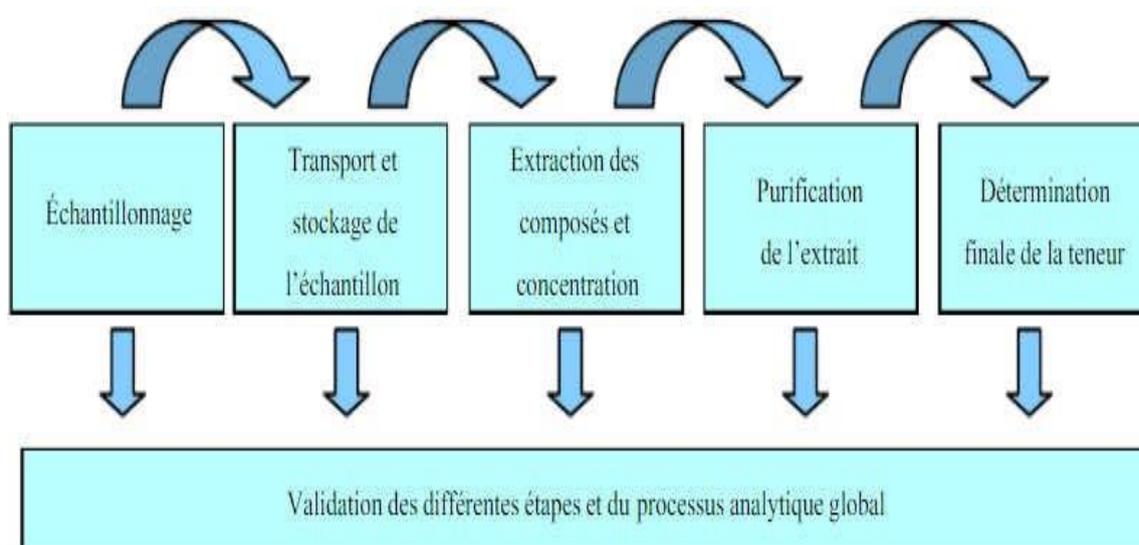
## PROBLEMATIQUE

Le contrôle des organismes nuisibles aux cultures (adventices, ravageurs et maladies) est essentiel à la production végétale agricole. Celle-ci fait encore largement appel à l'utilisation de produits phytosanitaires en vue d'optimiser et de sécuriser les systèmes de production mais est également à l'origine de contaminations environnementales et d'effets potentiellement préjudiciables pour la santé humaine et pour l'environnement. En particulier, leur utilisation peut conduire à la présence de résidus de pesticides dans les denrées alimentaires. (38)

La surveillance des résidus des pesticides dans le domaine de la santé publique est confrontée à la quantification et l'identification de centaines de molécules ayant des propriétés physico-chimiques différentes dans des matrices variées. Aussi des méthodes sensibles, sélectives, fiables et engendrant un cout modéré sont nécessaires et représentent un enjeu non négligeable voire même un défi pour les analystes.

C'est dans ce contexte de réglementation de la présence des pesticides, du respect de la conformité commerciale des produits et de garantie de la sécurité du consommateur que des méthodes analytiques capables d'identifier sans ambiguïté les pesticides et de les quantifier à de très faibles niveaux sont très fortement requises.

C'est dans cette même voie que notre objectif est sert à valider une méthode de dosage des résidus de carbofurane présent dans l'eau et le sol.



**FIGURE 6 :** Principales étapes d'une procédure analytique utilisée pour la détermination de pesticides dans des échantillons alimentaires. (39)

# Chapitre II

## **METHODES ANALYTIQUES**

## I. Introduction

L'analyse des résidus de pesticides est une activité complexe car les produits phytosanitaires appartiennent à des classes chimiques très diverses ; leur dosage nécessite donc l'utilisation de techniques variées et les limites de détermination demandées sont de plus en plus basses.

La description du devenir des pesticides et de leurs produits de dégradation dans l'environnement nécessite leur identification et leur dosage dans les sols et les eaux. A cette fin, il faut mettre tout un ensemble de techniques qui permettent d'obtenir les informations recherchées à partir d'échantillons prélevés dans les divers milieux où les pesticides peuvent être présents.

## II. Technique d'analyse : HPLC –UV

### 1. Principe

La chromatographie liquide haute performance appelé CLHP est une technique instrumentale qui permet de séparer les composants d'un mélange non volatile, thermosensible, de polarité élevée afin de les identifier et les quantifier. Elle met en œuvre, selon la nature de la phase stationnaire, des phénomènes de partage, d'adsorption, d'échange d'ions ou d'exclusion.

### 2. Appareillage

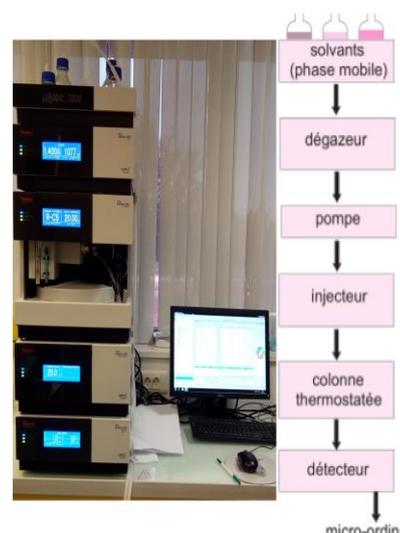
Un appareil CLHP (Fig.1.1) comporte différents modules: un réservoir contenant la phase mobile, un système de pompage, un injecteur, une colonne, un détecteur à travers lesquels un liquide entraîne les substances d'un mélange à séparer et un système d'acquisition de données. Il nécessite également un dispositif de dégazage. Les différents modules sont reliés par des canalisations courtes et de très faible diamètre interne (0,1 mm).

#### a. Un réservoir de solvant (éluant)

Le plus souvent ce réservoir est une bouteille en verre dans laquelle plonge un tube avec une extrémité filtrante en téflon qui contient la phase mobile en quantité suffisante.

Pour l'éluant utilisé doit nécessairement :

- ✓ Maintenir la stabilité de la colonne,
- ✓ Etre compatible avec le détecteur,
- ✓ Solubiliser suffisamment l'échantillon et ne pas gêner sa récupération. (40)



## b. Dispositif de dégazage

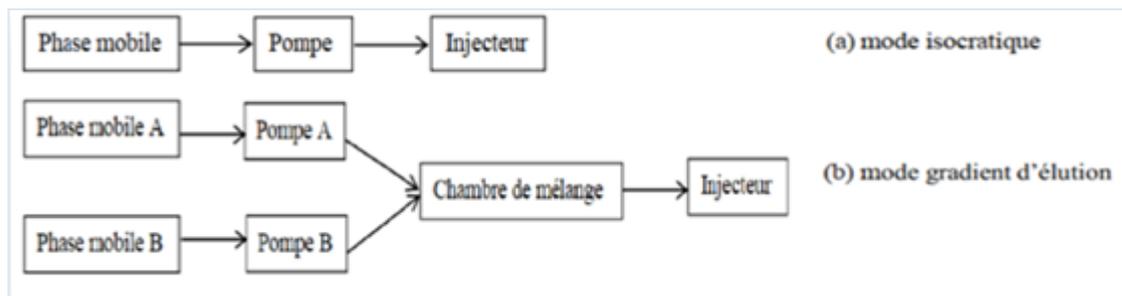
Durant le pompage, dans la chambre de mélange ou dans la colonne elle-même, si les solvants ne sont pas dégazés, l'air dissout dans le liquide soumis à de forte pression, forme des bulles à l'intérieur du système, c'est là un inconvénient majeur pour le fonctionnement de la plupart des détecteurs en particulier ceux qui utilisent des propriétés optiques. En règle générale, plus le liquide est polaire, plus la tendance de l'air à se dissoudre est forte. Il convient donc d'éliminer au maximum l'azote et l'oxygène qui peuvent être présents. Le dégazage de la phase mobile se fait par barbotage d'hélium, par ultrasons ou par un dégazeur. (40)

## c. La pompe

La pompe d'un chromatographe a pour rôle d'assurer l'écoulement de la phase mobile dans la colonne.

Elle permet de travailler:

- ✓ En **mode isocratique**, c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.
- ✓ En **mode gradient**, c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluant.



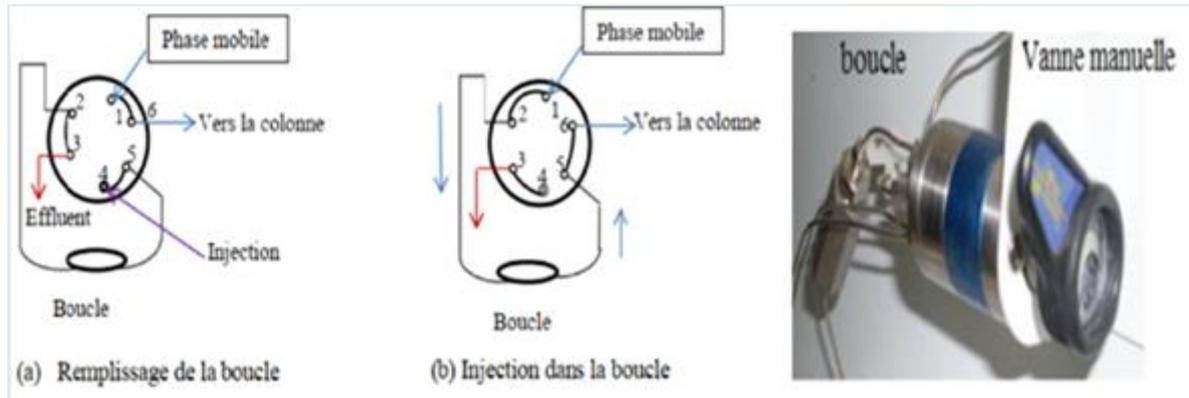
**FIGURE 7** : Représentation schématique d'un système de pompage. (40)

Actuellement les paramètres d'une pompe sont :

- ✓ Débit : 0,01 à 10 mL/min
- ✓ Stabilité < 1% (<0,2% pour des chromatographies d'exclusion diffusion)
- ✓ Pression maximale > 350 bars

#### d. Injecteur

Le type d'injecteur le plus couramment utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe (10, 20, 50  $\mu\text{L}$ ...). Cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne.



**FIGURE 8** : injecteur à boucle. (40)

#### e. Colonne

Les colonnes CLHP sont généralement courtes et droites en acier inoxydable se caractérise par:

- Nature en inox;
- Diamètre interne de  $\approx 4$  mm;
- Longueur = 5, 10, 15, ou 25 cm;
- Remplissage (en silice, silice greffée ou particules polymériques) a une granulométrie de 3, 5, ou 10  $\mu\text{m}$ .
- Le débit de la phase mobile ne peut dépasser quelques mL/min.

Ces colonnes ont l'avantage de la rapidité de l'analyse, consomment moins de solvant et conduisent à une meilleure résolution de l'analyse. (40)



#### f. Détecteur

Ces systèmes de détection sont des éléments indispensables au système chromatographique CLHP. Ils permettent de suivre en continu la séparation et de mesurer la concentration instantanée des différents solutés d'un mélange à analyser.

Dans notre cas la HPLC est équipée d'un détecteur Photomètre UV (Ultra-violet). (40)

### Photomètre UV

Le détecteur UV mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne et opère à longueur d'onde constante, celle-ci ayant été fixée par l'opérateur.

Pour que ce type de détecteur soit utilisable, il faut que:

- ✓ Le produit à détecter absorbe la lumière à une longueur d'onde accessible à l'appareil, et que son coefficient d'absorption soit suffisamment grand.
- ✓ La phase mobile n'absorbe pas la lumière à la longueur d'onde choisie par l'opérateur.
- ✓ Ce détecteur détecte seulement les changements dans le soluté donc on peut l'utiliser dans l'analyse par gradient d'élution.
- ✓ Le détecteur est facile à opérer et ne détériore pas l'échantillon. (40)

### g. La phase stationnaire et la phase mobile

#### i. La phase stationnaire

On distingue deux types de phase stationnaire :

#### La phase normale :

La phase normale est constituée de gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaires qui sortent en tête.

L'inconvénient d'une telle phase, c'est une détérioration rapide au cours du temps du gel de silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations.

#### La phase inverse :

La phase inverse est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (ACN, MeOH, H<sub>2</sub>O). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier.

Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante.

## ii. La phase mobile

L'interaction plus ou moins forte entre la phase mobile et la phase stationnaire normale ou à polarité inversée se répercute sur les temps de rétention des solutés.

La polarité de la phase stationnaire permet de distinguer deux situations de principe :

✚ Si la phase stationnaire est polaire :

On utilisera une phase mobile peu polaire la chromatographie est dite en phase normale.

✚ Si la phase stationnaire est très peu polaire :

On choisira une phase mobile polaire (le plus souvent des mélanges de méthanol ou d'acétonitrile avec de l'eau), c'est la chromatographie en phase inverse.

## III. METHODES D'EXTRACTION ET D'ANALYSE

### 1. Matériels de travail

#### a. Petits matériels

Le matériel utiliser dans la préparation des échantillons est le suivant :

- Spatule,
- Tubes en verre,
- Bucher,
- Micropipette de 100 à 1000  $\mu\text{L}$ ,
- Micropipette de 2 à 20  $\mu\text{L}$ ,
- Seringue,
- Filtre à seringue,
- Ampoule à décanté,
- Eprouvette graduée,
- Tube en plastique,
- Tube à centrifuger en verre,
- Pipete pasteur.

#### b. Appareillages

Les différents appareils utilisés dans la préparation et l'analyse des échantillons sont :

- Balance analytique,
- Agitateur magnétique,
- Centrifugeuse,
- Rota vapeur,
- Système HPLC équipé d'une colonne Pecosphère-3C C18 et d'un détecteur UV à barrette de diodes.
- Vortex,
- PH- mètre,
- Conductimètre,

### c. Réactifs

Les différents réactifs et solvants utilisés dans l'analyse sont :

- Le pesticide standard : le carbofurane , P = 99,8%
- Acétonitrile (qualité HPLC pour la colonne C18)
- Eau (qualité HPLC pour la colonne C18)
- $MgSO_4$
- NaCl
- Chitosane cristallisé

## 2. Méthodes d'échantillonnage

### a. Collecte des échantillons de l'eau du puits

Les prélèvements d'eau au niveau d'un puits ont été réalisés à l'aide d'un seau attaché au bout d'une corde et qui est remonté à l'aide d'une poulie. Ensuite un flacon de prélèvement en plastique munis d'un couvercle à vis d'une capacité de 500 mL ont été ensuite remplis, et transportés au laboratoire.

### b. Collecte des échantillons d'eau d'extrémité :

L'eau d'extrémité est prélevée à travers la quantité d'eaux restantes, qui s'accumulent à la surface de la terre après le processus d'arrosage.

### c. Collecte des échantillons de sol

Pour faire le prélèvement, un trou de la profondeur de la bêche a été creusé avec un espace suffisant pour retirer la terre qu'elle contient. Les échantillons élémentaires ont été prélevés après tri des pierres et des matières végétales et un échantillon final de laboratoire de 200 g a été prélevé.

## 3. Traitement des échantillons

### a. L'eau du puits

L'eau prélevé est analysé directement après une simple filtration par un filtre seringue.

### b. l'eau de surface

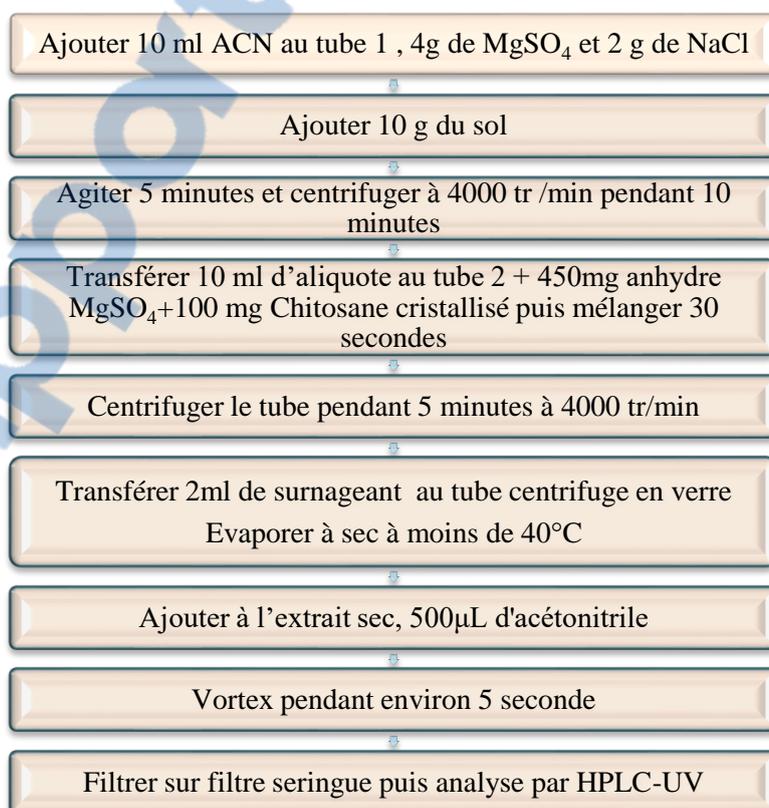
La méthode consiste à extraire le carbofurane qui se trouve dans l'eau par un solvant approprié et non miscible à l'eau.

Il consiste à transférer 10 mL d'échantillon dans une ampoule à décanter dans laquelle on ajoute 10 mL de solvant extractif constitué de l'acétonitrile. Le tout est agité vigoureusement en chassant périodiquement l'air et on laisse décanter pendant quelque minute au bout desquelles la phase organique est collectée dans un bucher. L'opération est répétée 3 fois avec 10 mL de solvant organique et les extraits recueillis dans le même bucher que précédemment. La solution est analysée directement par CLHP-UV.

### c. Le sol

L'Extraction du carbofurane a partir du sol est effectuée selon une version de la méthode de QuEChERS. Dans cette méthode le carbofurane est extraits dans une première étape à l'aide d'acétonitrile saturée avec sulfate de magnésium et chlorure de sodium suivi d'une étape d'extraction solide liquide avec des supports Chitosane. L'analyse ensuite est effectuée à l'aide d'une chaîne HPLC alliance.

Les étapes d'extraction et de purification sont présentées dans le diagramme schématique ci-dessous :



**FIGURE 9** : Diagramme schématique des étapes de préparation du sol.

# Chapitre III

## **VALIDATION DE LA METHODE D'ANALYSE ET DOSAGE DES ECHANTILLONS**

## I. Introduction

Pour choisir une méthode d'analyse, de nombreux critères devront être pris en compte, par exemple le nombre et la cadence des analyses qu'on va effectuer, la capacité d'investissement du laboratoire et les moyens humains dont il dispose, mais le but essentiel sera toujours de produire au moindre coût une donnée que personne ne puisse contester : un résultat d'analyse validé, appelé donnée analytique. Atteindre cet objectif nécessite, d'une part, de s'assurer de l'exactitude de la méthode choisie, d'autre part, de réduire le nombre de répétitions des analyses destinées à produire une même donnée.

## II. Contexte de la validation

### 1. Définitions

la validation est le processus qui consiste à évaluer une méthode, un instrument ou toute autre pièce de l'équipement, un matériel étalon, etc..., pour déterminer s'il est approprié pour le travail en cours et s'il répond aux espérances et aux besoins des analystes.

Selon la norme NF EN ISO / CEI 17025, il s'agit de la « confirmation par examen et l'apport de preuves objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies ». (35)

En fait, selon la norme U47-600-1, cette confirmation « consiste à comparer les valeurs des critères de performance déterminées au cours de l'étude de caractérisation de la méthode à celles attendues ou assignées au préalable (limites d'acceptabilité, objectifs à atteindre), puis à déclarer la méthode d'analyse valide ou non valide ». (36)

### 2. Critères

#### a. Linéarité

La linéarité d'une méthode est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle, à fournir une valeur d'information ou des résultats proportionnels à la quantité en analyte à doser dans le matériau d'essai.

## b. Limites de détection et de quantification

### i. La limite de détection LD

Est la concentration minimale de l'analyte qui peut être détectée avec une certitude acceptable, quoique non quantifiable avec la précision acceptable. Des définitions diverses sont utilisées, mais, c'est souvent la quantité d'analyte qui produit une réponse 3 fois plus grande que le niveau du bruit de fond du système de détection.

$$LDM = 3 \times S$$

LDM : limite de détection de la méthode  
S : écart type de réplique

### ii. La limite de quantification LQ

Est la concentration ou la masse minimale de l'analyte qui peut être évaluée quantitativement avec une précision acceptable. Elle devrait s'appliquer à la méthode analytique complète. Bien que différemment définie, la limite de quantification doit avoir une valeur plus grande que celle de la limite de détection c'est souvent la quantité d'analyte qui produit une réponse 10 fois plus grande que le bruit de fond.

$$LQM = 10 \times S$$

LQM : limite de détection de la méthode .  
S : écart type .

## c. Le ratio de conformité

Le calcul du ratio de conformité nous permet de déterminer la validité d'une démarche pour l'établissement d'une limite de détection.

Il se calcule selon l'équation suivante :

$$R = \frac{\bar{X}}{LDM \text{ calculée}} = \frac{\bar{X}}{3S}$$

R : ratio de conformité  
 $\bar{X}$  : moyenne arithmétique des n réplique .  
S : écart type des n réplique .  
LDM : limite de détection de la méthode

$4 < R < 10$	$R < 4$	$R > 10$
La concentration utilisée est adéquate	Ce ratio indique que la limite réelle de détection de la méthode est plus élevée que la limite de détection estimée lors des essais.	Ce ratio indique que la limite réelle de détection de la méthode est plus basse que la limite de détection estimée lors des essais.

**TABLEAU 5 :** Interprétation de la valeur du ratio de conformité (R).

#### d. Fidélité

A un niveau donné, c'est l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus en appliquant le procédé expérimental à plusieurs reprises dans conditions déterminées.

Selon les conditions d'exécution de l'essai, cette caractéristique s'exprime sous forme de réplicabilité, de répétabilité ou de reproductibilité.

##### i. Réplicabilité

La réplicabilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels successifs obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire et dans les conditions suivantes : même analyste, même appareil, même jour.

La valeur sera déterminée à partir de l'équation suivante :

$$\frac{t_{(0,975 ; n-1)} \times S_1}{\sqrt{n}}$$

$t_{(0,975 ; n-1)}$  : constante dépendant du degré de concentration désiré  
 $n$  : le nombre de mesure effectuées  
 $s_1$  : écart de la réplicabilité

##### ii. Répétabilité

La répétabilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire et dont au moins l'un des éléments suivants est différent : l'analyste, l'appareil, le jour.

La valeur sera déterminée à partir de l'équation suivante :

$$\frac{t_{(0,975 ; n-1)} \times S_2}{\sqrt{n}}$$

$t_{(0,975 ; n-1)}$  : constante dépendant du degré de concentration désiré  
 $n$  : le nombre de mesure effectuées  
 $s_2$  : écart de la répétabilité

### iii. Reproductibilité

La reproductibilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans des laboratoires différents et dans les conditions suivantes : analyste différent, appareil différent, jour différent ou même jour.

La valeur sera déterminée à partir de l'équation suivante :

$$\frac{t_{(0,975 ; n-1)} \times S_3}{\sqrt{n}}$$

$t_{(0,975 ; n-1)}$  : constante dépendant du degré de concentration désiré  
 $n$  : le nombre de mesure effectuées  
 $s_3$  : écart de la reproductibilité

### e. Justesse

La justesse à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre la valeur certifiée par un organisme reconnu et le résultat moyen qui serait obtenu en appliquant dix fois le procédé expérimental ( $n = 10$  replica). La justesse se mesure, à un niveau donné de concentration, dans la zone quantifiable pratique de la méthode.

Elle s'exprime par l'erreur relative.

$$\text{Justesse}(\%) = 100 - |\text{Erreur relative}(\%)|$$
$$\text{Erreur relative}(\%) = \frac{V_o - V_s}{V_s} \times 100$$

$V_o$  : moyenne des valeurs observées  
 $V_s$  : valeur suggérée

### III. Résultats et discussions

#### A. Conditions d'analyses

##### 1. Principe de la méthode

L'objectif de ce travail est la validation d'une méthode de dosage du carbofurane par HPLC équipée d'un détecteur UV à polarité de phases inversée.

##### 2. Produits chimiques et réactifs

- ✚ Le pesticide standard : Carbofurane est de pureté supérieure à 99 %.
- ✚ Acetonitrile SIGMA ALDIRITCH, grade HPLC.
- ✚ Eau SIGMA ALDIRITCH, grade HPLC.

##### 3. Instrumentation et conditions chromatographiques

###### a. Appareillage

L'instrument utilisé est un appareil HPLC de type Ultimate 3000 de marque Thermo Fisher Scientifique, fonctionne équipé d'un injecteur à boucle d'échantillonnage d'injection de 20  $\mu\text{L}$ , d'un four (25 à 90  $^{\circ}\text{C}$ ), d'une pompe d'injection (4 à 400 bar) et d'un détecteur UV à barrette de diodes (DAD) de longueurs d'ondes 190 à 400 nm . Toutes les analyses ont été effectuées à température ambiante (25 $^{\circ}\text{C}$ ) dans le mode isocratique d'élution.

La séparation est réalisée en utilisant une colonne de type Sunfire C18 de marque Water, de 250 millimètres et 4,6 millimètres de diamètre avec une taille des billes de 5 micromètres.

###### b. Condition d'analyse

Les paramètres optimisés dans l'analyse sont les suivants :

Pesticide	Composition de la phase mobile		Débit (mL/min)	Longueur d'onde (nm)	Temps totale d'analyse (min)
	ACN %	Eau %			
	Carbofurane	80	20	1,4	194

**TABLEAU 6 :** les conditions analytiques pour la détection du carbofurane par HPLC-UV.

## 4. Préparation des solutions standards du carbofurane

Tout d'abord nous avons procédé à la préparation d'une solution mère par dissolution d'une quantité exactement pesée de 0,84 mg du carbofurane dans 1 ml d'acétonitrile pour préparer de concentration de 0,84 mg/ml.

Ensuite on a préparé des solutions intermédiaires à différentes concentrations : ( $5 \cdot 10^{-1}$  mg/ml,  $10^{-1}$  mg/ml,  $5 \cdot 10^{-2}$  mg/ml,  $10^{-2}$  mg/ml,  $5 \cdot 10^{-3}$  mg/ml et  $10^{-3}$  mg/ml) diluer dans l'acétonitrile. Chaque solution a été injectée une seule fois pour déterminer le domaine de linéarité.

Ces solutions ont été utilisées comme une gamme d'étalonnage

## 5. Validation de la méthode

Le procédé a été validé par la détermination de la linéarité, limites de détection (LD), de quantification (LQ), le ratio de conformité, fidélité et justesse.

### B. Validation de la méthode d'analyse

#### 1. Linéarité

La linéarité instrumentale a été déterminée par l'injection de la solution standard analytique à 6 niveaux de concentration allant de 0,5 mg/ml à 0,001 mg/ml. (ANNEXE II: A)

La figure 1 représente les courbes de régression correspondant aux carbofurane dans la solution standard pour tout le domaine d'étude (à droite) et pour le domaine restreint (à gauche).

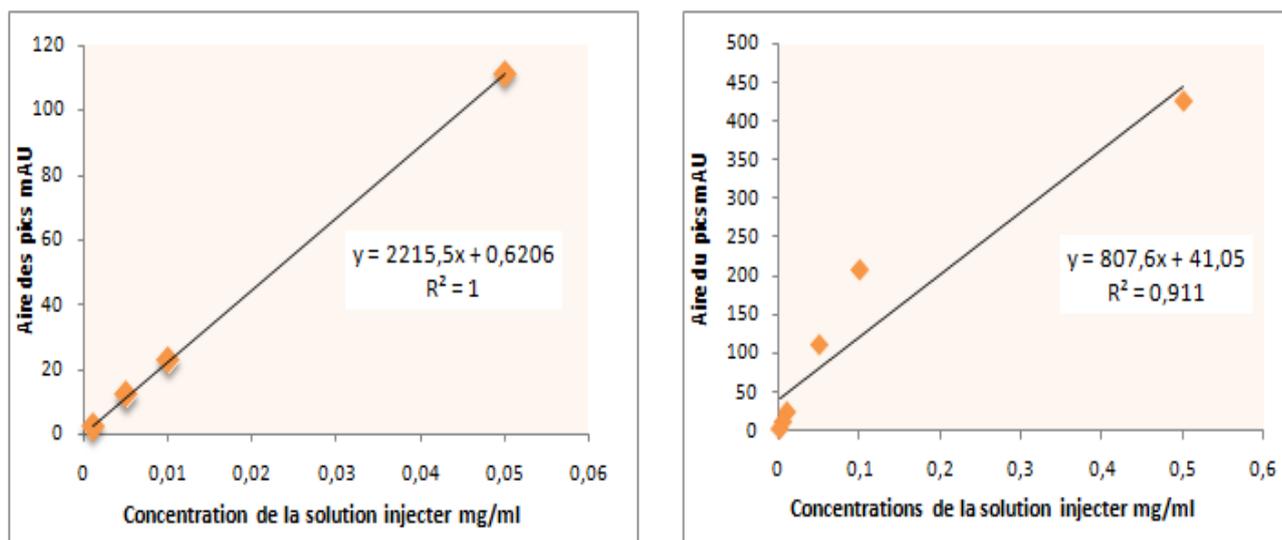


FIGURE 10 : Linéarité obtenue pour la solution standard du carbofurane pour tout le domaine d'étude (à droite) et pour le domaine restreint (à gauche).

La courbe d'étalonnage du carbofurane est nettement non linéaire à des concentrations supérieures à 0,01 mg/ml.

Or, la bonne linéarité n'est observée que dans un intervalle entre 0,05 à 0,001 mg/ml (4 concentrations différentes ont été utilisées).

L'équation de la droite de régression est de la forme :  $y = a.x + b$  (x:concentration du carbofurane en mg/mL et y: aire du pic).

Les paramètres étudiés	La solution standard du carbofurane
Ordonnée à l'origine (b)	0,620
Pente de la droite (a)	2215,5
Coefficient de corrélation ( $R^2$ )	> 0,995

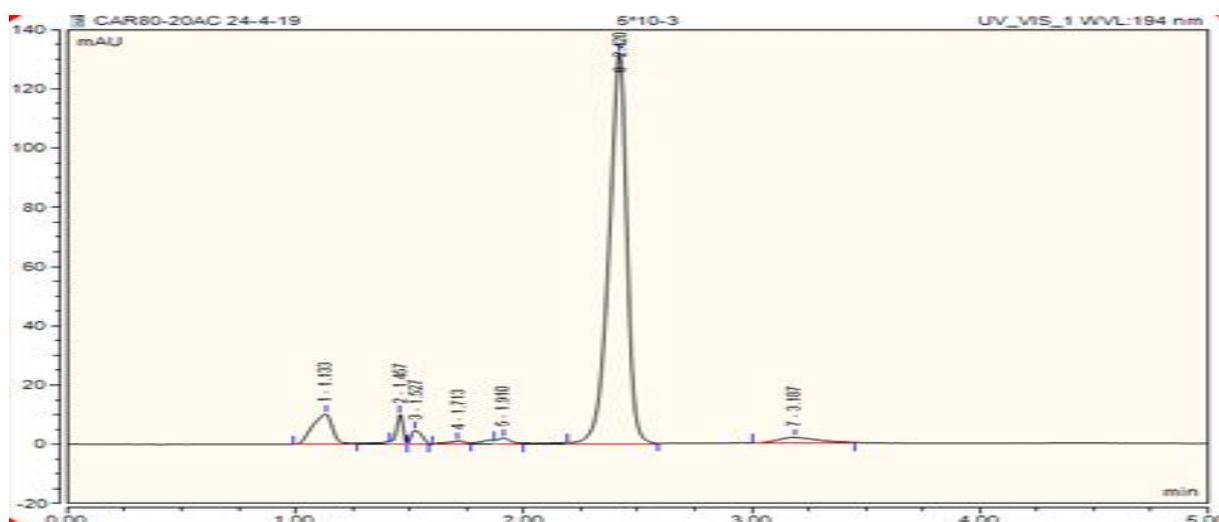
**TABLEAU 7 :** Paramètres de la linéarité.

Le coefficients de corrélations de la droite de régression correspondant aux carbofurane dans la solution standard est supérieurs à 0,995.

On peut donc conclure, que la méthode de dosage du carbofurane par HPLC-UV est linéaire dans cet intervalle.

## 2. La limite de détection, de quantification et le ratio de conformité R

Durant notre étude, nous avons injecté dix fois une solutions de concentration de  $5.10^{-3}$  mg/ml par chromatographie liquide à haute performance. Des chromatogrammes enregistrés, on a relevé les aires des pics de chacune des injections puis on a calculé la concentration de chaque injection par la droite de régression :  $y = a.x + b$  (ANNEXE II : B).



**FIGURE 11 :** Le spectre du carbofurane standard détecter par HPLC-UV à une concentration de  $5.10^{-3}$  mg/ml.

Moyennant les formules mentionnées des différents paramètres calculés eu les valeurs regroupées dans le tableau suivant :

Moyenne	Ecart type	LDM	Ratio de conformité	LQM
$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$	$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}{n-1}}$	$3 \times s$	$R = \frac{\bar{x}}{\text{LDM calculée}} = \frac{\bar{x}}{3 \times s}$	$10 \times s$
<b>0,005</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0005</b>	<b>9,8205</b>	<b>0,0017</b>

Selon les résultats obtenus, le ratio de conformité est compris entre  $4 < R=9,8205 < 10$  ce qui indique que la concentration de la solution utilisée est adéquate.

On peut donc conclure, puisque le ratio de conformité est acceptable, la limite de détection ainsi établie est acceptée.

### 3. Fidélité

#### a. Réplicabilité

Afin d'évaluer la réplicabilité, nous avons effectués 10 injection sur la dernière concentration détectable par la méthode d'analyse, préparés par même operateur, dans le même laboratoire, au même jour, avec même appareil

Les résultats obtenus sont regroupées dans le tableau suivant :

Moyenne	Ecart type	Réplicabilité
$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$	$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}{n-1}}$	$\frac{t(0,975; n-1) \times S_1}{\sqrt{n}}$
<b>0,0051</b>	<b>0,0002</b>	<b>Réplica(-) : 0,00502 ; Réplica(+) : 0,00526</b>

Les dix essaies effectuer donne des résultats compris entre  $0,00502 \text{ mg/ml} < [C] < 0,00526 \text{ mg/ml}$ .

On conclure selon les résultats obtenus que la méthode d'analyse est réplicable.

### b. Répétabilité

La répétabilité du carbofurane est évaluée à l'aide de l'injection de trois solutions de même concentration ( $5 \cdot 10^{-3}$  mg/ml) préparés par trois opérateurs différents, dans le même laboratoire, au même jour, avec même appareil.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Opérateurs	Concentration	Aire de pic	Résultats analytique
			$x = \frac{y - b}{a}$
A	0,005	11,577	0,00494534
B	0,005	11,819	0,00505466
C	0,005	11,657	0,00498144

Les valeurs obtenues sont homogènes ce qui montrent une précision convenable pour la méthode analytique.

### c. Reproductibilité

De la même manière que pour l'évaluation de la répétabilité, nous avons effectués l'injection de trois solutions de même concentration ( $5 \cdot 10^{-3}$  mg/ml), préparés par des opérateurs différents, analysés dans trois laboratoires différents.

Les résultats sont les suivants :

Laboratoires	Concentration	Aire de pic	Résultats analytique
			$x = \frac{y - b}{a}$
A	0,005	11,577	0,00494534
B	0,005	11,476	0,00490002
C	0,005	11,707	0,00500406

On observe que les résultats obtenus par les différents laboratoires sont semblables et homogènes.

Donc, la fidélité de la méthode est jugée acceptable.

## 4. Justesse

Pour calculer la justesse nous avons effectué dans la même concentration détecteur par la méthode d'analyse ( $5 \cdot 10^{-3}$  mg/ml) dix injections, dont les valeurs suggérées sont fournies par la HPLC-UV.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau ci-dessous :

[ ] réelle de l'échantillon	Moyenne	Erreur relative %	Justesse
$5 \cdot 10^{-3}$	$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$	$\frac{V_o - V_s}{V_s} \times 100$	$100 -   \text{Erreur relative}(\%)  $
0,005	0,0051	2,9	99,97

Les résultats du test de justesse montrent que l'erreur relative ne dépasse pas une valeur précisée (généralement autour de 10 %). On l'estime par la différence entre la moyenne d'un nombre fini de valeurs mesurées et la valeur de référence est très faible.

On conclure que la méthode est juste.

## C. Dosage des résidus du carbofurane

### 1. Objectif

Application de la méthode validée pour le dosage des résidus du carbofurane dans l'eau du puits, l'eau d'extrémité et le sol, échantillonnés à partir de notre zone d'étude.

### 2. Propriétés physico-chimiques

Echantillons	Température (°C)	PH	Conductivité (us/cm)
L'eau du puits		2,35	1863
L'eau d'extrémité	25	7,40	855
Le sol		2,61	1243

**TABLEAU 8 :** les propriétés physico-chimiques des échantillons.

### 3. Dosage du carbofurane dans l'eau du puits

Après filtration d'une quantité d'eau du puits, 1ml d'eau est injecter directement dans la HPLC-UV dans les mêmes conditions optimisées par la méthode validé précédemment.

Le chromatogramme enregistré est le suivant :

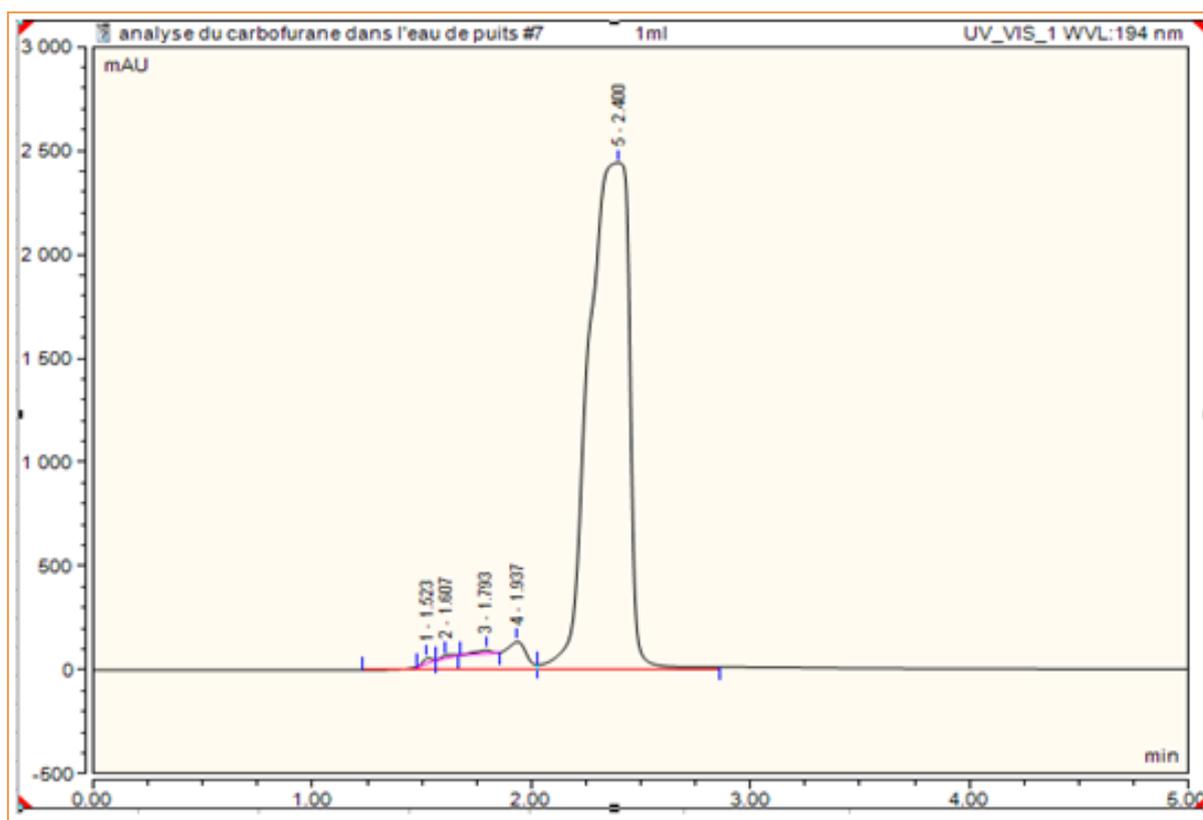


FIGURE 12 : Le spectre du carbofurane détecter dans l'eau du puits par HPLC-UV .

Un spectre clair et bien séparer est obtenu après l'injection de l'échantillon dans un temps de rétention de  $t_r = 2,5$  min. Il s'agit d'un signale du carbofurane (en comparaison avec l'étude du carbofurane standard précédente).

La quantification du carbofurane est calculée selon l'équation de la droite de régression validé par la méthode optimisée ( $y = a \cdot x + b$  (x: concentration du carbofurane en mg/mL et y: aire du pic)).

En conclusion, la concentration doser dans l'eau du puits est de  $[C_P] = 0,24$  g/l.

#### 4. Dosage du carbofurane dans l'eau d'extrémités

Après l'extraction du carbofurane par la méthode d'extraction déjà mentionner dans le chapitre II , 1ml de la solution obtenus est injectée

Le chromatogramme enregistré est le suivant :

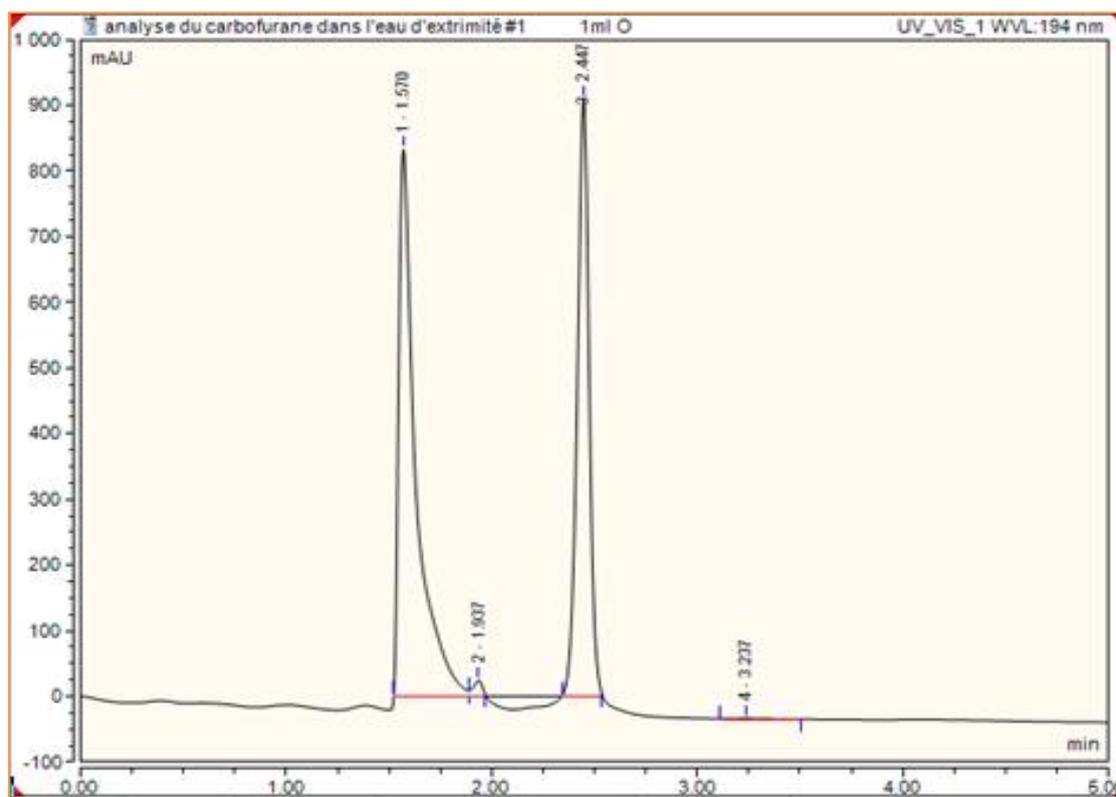


FIGURE 13 : Le spectre du carbofurane détecter dans l'eau d'extrémités par HPLC-UV.

Un spectre fine et clair est enregistré dans un temps de rétention de  $t_r = 2,5$  min. Il s'agit du carbofurane .

On observe l'apparition d'un autre signale avant le spectre de notre pesticide. Il peut être l'un de ses métabolites qui sont apparus au cours du processus d'extraction.

En bref, la concertation du carbofurane dans l'eau d'extrémités évaluée par l'équation de la droite de régression est de  $[C_E] = 0,027$  g/l.

## 5. Dosage du carbofurane dans le sol

Le protocole mis en œuvre pour l'extraction du carbofurane à partir du sol est celui d'une version de la méthode de QuEChERS figurant sur la partie II.

L'extrait final obtenu par cette méthode est directement utilisé pour l'analyse.

Le chromatogramme détecteur est ci-dessous :

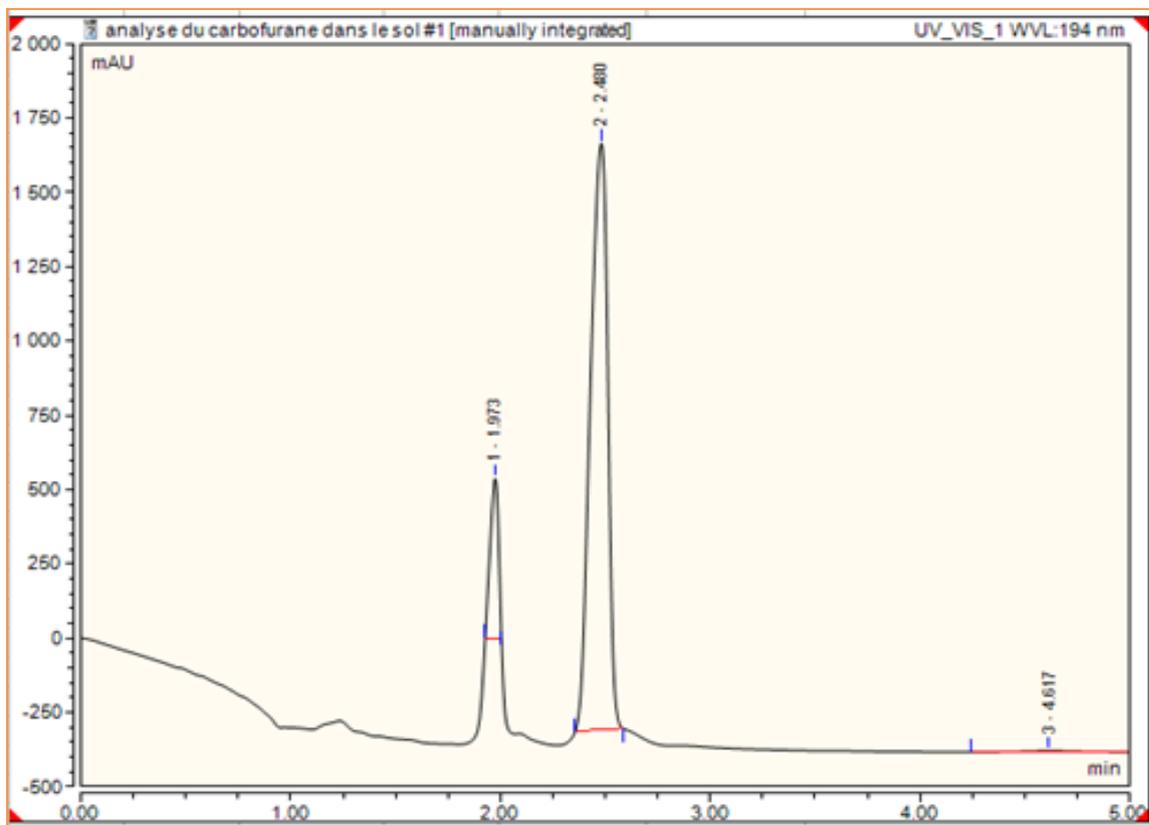


FIGURE 14 : Le spectre du carbofurane détecté dans l'eau d'extrémités par HPLC-UV.

L'analyse de l'extrait du sol par HPLC est montrée la présence du carbofurane à un temps de rétention de  $t_r = 2,5$  min (l'autre spectre est due à la dégradation du carbofurane dans le sol).

En conclusion, la concentration enregistrée du carbofurane dans le sol selon l'équation de la droite de régression est de  $[C_s] = 0,084$  g/l.

## CONCLUSION GENERALE

Notre travail a consisté à l'analyse et à la validation d'une méthode de dosage permettant la détection des résidus d'un pesticide connus sous le nom du carbofurane couramment utilisés en agriculture pour le traitement des cultures des fruits par Chromatographie Liquide Haute Performance à polarité de phases inversée couplée à un détecteur à barrette de diodes.

Premièrement,

Nous avons déterminée les paramètres optimaux permettant l'analyse du carbofurane par HPLC/DAD avec une colonne de type Sunfire C18 de marque Water (4,6\*250 mm ; 5 $\mu$ m), à  $\lambda$ = 194 nm, une phase mobile constituée d'un mélange binaire Acétonitrile-Eau (80:20 ; v/v), à débit 1,4 mL min<sup>-1</sup> et une température de 25°C.

Nous avons, par ailleurs, validé la méthode de dosage du carbofurane. Ainsi, nous avons pu montrer que la méthode de dosage adoptée est conforme, exacte, fidèle et linéaire entre 0,05 mg mL<sup>-1</sup> et 0,001 mg mL<sup>-1</sup>. La limite de détection et de quantification du carbofurane sont respectivement de 0,0005 mg mL<sup>-1</sup> et 0,0017 mg mL<sup>-1</sup>.

En conclusion, la méthode optimisée est : rapide, facile à mettre en œuvre, non couteuse, linéaire , exacte , répétable et reproductible.

Deuxièmement,

Cette méthode validée est appliquée pour le dosage des résidus du carbofurane dans l'eau du puits , l'eau d'extrémité et le sol , échantillonner à partir d'une zone agricole intégrée dans la région de rabat-sale-kenitra .

la concentration déterminer du carbofurane dans l'eau du puits , l'eau d'extrémité et le sol par chromatographie liquide à haute performance sont respectivement de 240mg/kg , 27mg/kg et 84 mg /kg.

En conclusion, d'après les limites de tolérance de résidus fixées par la Direction des aliments du Ministre de l'Agriculture du Développement Rural et des Pêches Maritimes, l'apport alimentaire maximal de carbofurane serait, en théorie, de 0,1 mg/Kg, qui est une valeur beaucoup plus faible par rapport à l'apport réel dosé au cours de notre étude.

## Bibliographie :

- (1): CALVET.R. 2005, Les pesticides dans le sol. édition France Agricole.
- (2): EL-MRABET, These-El-Mrabet-Methode-Analyse-Residus -Pesticides , (page 19) .
- (3): MIQUEL, (2003) , La qualité de l'eau et l'assainissement en France, Rapport 293.
- (4): TOR. A.; M.EMIN AYDIN; S.OZCAN, J. (2006),Ultrasonic solvent extraction of organochlorine pesticides from soil , Analytica Chimica Acta 173–180.
- (5): AWATEF BERRAH , Memoire Online - Etude sur les pesticides .
- (6): Programme Africain relatif aux Stocks de Pesticides obsolètes , Rapport FAO .
- (7): Index phytosanitaire ACTA,(2006), Association de coordination technique agricole.
- (8): Byung-Youl Oh, "Pesticide Chemistry and Biochemistry", FAO/IAEA Training and Reference Centre for Food and Pesticide Control, Director of Pesticide Division, NIAST, RDA, Suweon , p. 441-707.
- (9): WARE G. AND WHITACRE D, (2004), An introduction to insecticides, 4th Ed. In The Pesticide Book, 6th Ed. Meister Media Worldwide, Willoughby, Ohio, p. 496.
- (10): J. BOLAND ; I.KOOMEN ; J. VAN LIDTH ; D.E. JEUDE ; J.OUDEJANS. (2004), Les pesticide composition, utilisation et risques. Editions Agrodok .
- (11): VIEL J.F., CHALLIER B., PITARD A., POBEL D., (1998) “Brain Cancer Mortality among French Farmers: The Vineyard Pesticide Hypothesis” Archives of environmental Health, 53, pp: 65-70.
- (12): MEYER A., CHRISMAN J., MOREIRA J.C., KOIFMAN S., (2003) “Cancer mortality among agricultural workers from Serrana Region, state of Rio de Janeiro, Brazil”, Environmental Research, 93, pp: 264-271.
- (13): LEVARIO-CARILLO M., AMATO D., OSTROSKY-WEFMAN P., GONZALES-HORTA C., CORONA Y., SANIN L.H., (2004) “Relation between pesticide exposure and intrauterine growth retardation” Chemosphere, 55, pp: 1421-1427.
- (14): LEVITAN L.(1997) “An Overview of pesticide impact assessment systems (a.k.a. "Pesticide Risk Indicators") based on Indexing or Ranking Pesticides by Environmental Impact, Background Paper Prepared for the Organisation of Economic Cooperation and Development (OECD)Workshop on Pesticide Risk Indicators, Copenhagen, Denmark.
- (15): KELLEY J.R., DUGGAN J.M., (2003)“Gastric cancer epidemiology and risk factors” Journal of Clinical Epidemiology, 56, pp: 1-9 .
- (16): Comite Sécurité Alimentaires d'Aprifel , (2004) "Pesticides , risques et sécurité alimentaire " Aprifel : Agence pour la recherche et l'information en fruit et légumes frais , pp : 98 , 15 .
- (17): PR.ALAIN BOTTA. LAURENCE BELLON.( 2004) Pollution chimique de l'eau et santé humaine. Service de médecine en santé au travail. Laboratoire de biogénotoxicologie et mutagenèse environnementale. (EA 1784. IFR PMSE. 112): 18-19.
- (18): MOHAMED ERRAMI , Thèse en Co-tutelle : (2012), Devenir atmosphérique de bupirimate et transfert de ses métabolites (les diazines) dans l'atmosphère, sa dissipation dans les fruits de tomate et sa dégradation électrochimique,Soutenue publiquement ,pp: 21.
- (19): Union des Industries de la Protection des Plantes <http://www.uipp.org/Services-pro/Chiffres-cles/Reperes-monde-et-europe> .
- (20): Anonyme.(1989). Répertoire des pesticides à usage agricole autorisés au Maroc. Ministère de l'agriculture et de la réforme agraire. Direction de la protection des végétaux ,des contrôles techniques et de la répression des fraudes pp.73.Rabat,Maroc.

- (21):**GHALIB M., ABDELJALIL A., BENADA M., HORMATALLAHA., DAHCHOURA. ET CHTAIHA A.(1992).Etude du Secteur des pesticides au Maroc et perspectives.pp 60.office pour le développement industriel. Rabat, Maroc .
- (22):** Loi n°42-95 relative au contrôle et à l'organisation du commerce des produits pesticides à usage agricole, promulguée par le dahir n°1-97-01 du 12 Ramadan 1417 (21janvier 1997) .
- (23):**AIDA KESRAOUI-ABDESSALEM , (2008),dégradation des pesticides chlortoluron, carbofurane et bentazone en milieux aqueux par les procédés d'oxydation avancée , pp: 12 .
- (24):**BAVERSTOCK, MICHAEL GEORGE DOUGLAS ET AL, BOULT, WADE ,(1983), StTENNANT 27 Furnival Street London, EC4A1PQIGB), Improved process for the preparation of carbofuran and novel intermediate , Bulletin 83.
- (25):** <https://www.researchgate.net/figure/Mecanisme-daction-toxique-dun-carbamate-le-carbofuran-fig4> .
- (26):** Conseil national de recherches du Canada.(1979),Carbofurane : Critères pour interpréter les effets de son utilisation sur l'état de l'environnement. CNRC no 16741, Ottawa.
- (27):** <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v96pr03.htm> .
- (28):** DOROUGH, HW (1968) Métabolisme du Furan (NIA-10242) chez le rat et le les mouches domestiques. J. Agric. Food Chem., 16, 319-325.
- (29) :** PPDB. (2012), Pesticide Properties Data Base.
- (30):** EXTOXNET (consulté le 2 /05/ 2012) .
- (31) :**<http://aanesan.wordpress.com/2009/11/22/carbofuran-in-thailand-a-public-health-risk> consulté le18 /06/2012.
- (32) :** DRP. (1995). Pesticide Use Report. Sacramento, California : Environmental Protection Agency California . departement of pesticide Regulation. P78.
- (33) :** Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire, (2009). Projet de décision de réévaluation du carbofuran - PRVD2009-11, Santé Canada, CANADA. Pages: 11, 12, 53, 54.
- (34) :**<http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/insect-mite/cadusafoscyromazine/carbofuran/insect-prof-carbofuran.html> (Consulté le 8 /06/2012).
- (35) :**<http://www.wildlifeextra.com/go/news/carbofuran-ban978.html#cr>. (Consulté le 28 /05/2012).
- (36) :**<http://www.thedailygreen.com/enironmentalnews/latest/carbofuran-pesticidebanned-consulté> 28/05/2012.
- (37):** Secrétariat de la Convention de Rotterdam sur la procédure de consentement préalable en connaissance de cause applicable à certains produits chimiques et pesticides dangereux qui font l'objet d'un commerce international , (2007). Document d'orientation des décisions Carbofuran .
- (38):** REGNAULT-ROGER, C., FABRES, G., PHILOGENE, B., (2005). Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement.
- (39):** A. BEYER, M. BIZIUK, Food Chemistry , (2008) . Article , pp: 669-680.
- (40):** Dr. BOUCHELOUKH HADJIRA , Cours Méthodes d'Analyses Chromatographiques , Jijel Faculté des Sciences Exactes et de l'Informatique Département de Chimie , pp : 30-35 .

# ANNEXE I

Royaume du Maroc



MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE, DU DÉVELOPPEMENT RURAL ET DES PÊCHES MARITIMES

N/Réf 892 /DCTP/PV/BPH/SIC

Rabat, le 18 AVR 2006

## HOMOLOGATION

(Valable pour dix ans du 17/04/2006 au 16/04/2016)

*Vu la loi n° 42-95 du 8 chaabane (19 décembre 1996) relative au contrôle et à l'organisation du commerce des produits pesticides à usage agricole ;  
Vu le Dahir du 12 rabii II (2 décembre 1922) portant réglementation sur l'importation, la détention et l'usage des substances vénéneuses modifié par les Dahirs du 6 avril 1928, 4 novembre 1932 et 17 mars 1953 ;  
Vu le Décret n° 2-99-105 du 18 moharrem 1420 (5 mai 1999) relatif à l'homologation des produits pesticides à usage agricole.  
Après avis de la Commission des Pesticides à Usage Agricole, instituée par Décret n°2-01-1343 du 17 septembre 2001, réunie le 30/03/2006.*

La Spécialité	AXLERA 5G
Matière Active	5 % Carbofuran
Formulation	Microgranulé (MG)
Classée au tableau	A de la classification toxicologique
Homologuée sous le Numéro	E04-6-003
Société mère	FMC
Est autorisée à être vendue par la société	<b>MARBAR CHIMIE</b> Bd. Aicha Bent Haimoud - B.P: 2929 - Casablanca

### 1- Pour usage agricole: Lutte contre les insectes du sol:

- Tomate: Ver blanc: 20 kg/ha.
- Betterave à sucre: Cléone mendiant et taupins: 20 kg/ha.

### 2- Conditions d'utilisation:

Les granulés doivent être **déposés au moment du semis** et doivent être enfouis avec un matériel adéquat dans la raie de semis, aucun reliquat ne devant rester apparent à la surface du sol. Cette opération doit être suivie d'une irrigation.

### 3- Limites Maximales de Résidus (Provisoires):

- Tomate : 0,1 mg/kg.
- Betterave à sucre : 0,1 mg/kg.

P. Le Directeur de la Protection des  
Végétaux des Contrôles Techniques et  
de la Répression des Fraudes  
Le Chef de la Direction des Contrôles  
Techniques et Subsistances

Signé : M. CHOUIBANI

1/2

Direction de la Protection des Végétaux, des Contrôles Techniques et de la Répression des Fraudes  
DPVCTRF, B.P. 1308, Rabat, Maroc - Tél. 212 37 29 7543 - 212 37 29 7544, E-mail: dpvctrf@nomade.fr

## ANNEXE II

A. Les résultats analytiques de la solution standards du carbofurane à six niveaux de concentration :

CONCENTRATION mg/ml	AIRE DE PIC mAU
0,5	425,5276
0,1	208,0667
0,05	111,351
0,01	24,4653
0,005	12,0296
0,001	2,7802

B. Les résultats analytiques de la concentration  $[C]=5 \cdot 10^{-3}$  mg/ml :

CONCENTRATION mg/ml	AIRE DE PIC mAU	RESULTATS ANALYTIQUES mg/ml
$C5 \cdot 10^{-3}$	11,9263	0,005103002
$C5 \cdot 10^{-3}$	12,1686	0,005212367
$C5 \cdot 10^{-3}$	11,7953	0,005043873
$C5 \cdot 10^{-3}$	11,8082	0,005049695
$C5 \cdot 10^{-3}$	11,7071	0,005004062
$C5 \cdot 10^{-3}$	11,4766	0,004900023
$C5 \cdot 10^{-3}$	12,6153	0,005413992
$C5 \cdot 10^{-3}$	11,7596	0,005027759
$C5 \cdot 10^{-3}$	12,5018	0,005362762
$C5 \cdot 10^{-3}$	12,4366	0,005333333

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques



**Nom et prénom:** IDRISSI FIRDAOUS

**Année Universitaire :** 2018/2019

**Titre:** Optimisation et validation d'une méthode de dosage du carbofurane dans des échantillons de l'eau et du sol par chromatographie liquide haute performance .

### Résumé

L'objet de ce travail est la validation d'une méthode de dosage du carbofurane par HPLC/DAD à polarité de phases inversée.

L'analyse chromatographique a été réalisée sur une colonne de type Sunfire C18 de marque Water (250 mm \* 4,6 mm et une granulométrie de 5 µm) à 25 °C à 194 nm avec une phase mobile constituée d'Acétonitrile-Eau (80:20, v/v) et à débit de 1,4 mL min<sup>-1</sup>.

L'intervalle de linéarité est compris entre 0,05 à 0,001 mg mL<sup>-1</sup>. Les coefficients de corrélation (R<sup>2</sup>) des équations de régression sont supérieurs à 0,995. La précision de la méthode est démontrée par la comparaison avec d'autre laboratoire à différents manipulateurs.

Selon les résultats de la validation, la méthode proposée est simple, conforme, linéaire, exacte et peut être appliquée à l'analyse du carbofurane à différentes matrices.

**Mots clés :** Carbofurane, carbamate, pesticide, insecticide.

### Abstract:

The objective of the current study is to develop and validate a reverse-phase HPLC for the determination of carbofuran.

Chromatographic analysis was performed on a column of type Sunfire C18 de marque Water (250 mm \* 4.6mm grain size of 5 µm) at 25 °C using a diode array detector (DAD) at 194 nm and a mobile phase was composed of acetonitrile-Water (80:20, v/v) delivered at flow 1,4 mL min<sup>-1</sup>.

The method is linear in a concentration range from 0,05 to 0,001 mg mL<sup>-1</sup>. The correlation coefficients (R<sup>2</sup>) regression equations are greater than 0.995. The precision of the method is demonstrated by comparison with other laboratories to different manipulator.

The results of the validation, the proposed method is simple, consistent, linear, accurate and could be applied to the analysis of carbofuran at different matrices.

**Key words:** Carbofuran, carbamate, pesticide, insecticide.