

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de La Recherche Scientifique

Ecole Nationale Polytechnique



المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
Ecole Nationale Polytechnique

Département Génie de l'Environnement

Mémoire de Master

Présenté par

M. SALHI Abdessamie

Pour l'obtention du diplôme master en Génie de l'Environnement

Thème :

*Analyse des pesticides sur LC-MS/MS par la méthode QuEchers dans la matrice (eau)*

Présenté et soutenus publiquement le 13/10/2016

Composition du jury :

Président :	M. R. KERBACHI	Professeur à l'ENP
Promoteurs :	M. A. CHERGUI	Professeur à l'ENP
Examineur :	Mme. S. AROUA	MCB à l'ENP

ENP 2016

---

*DEDICACE*

---

Aux deux êtres qui me sont les plus chers au monde, mes parents, ma mère qui m'a toujours soutenue, et mon père qui a tout fait pour que je ne manque de rien, Que Dieu vous protège

A mes frères et sœurs

A mes amis

A tous ceux qui me sont chers

---

## REMERCIEMENT

---

Je rends grâce à Dieu, miséricordieux de m'avoir soutenu et donné la volonté, la persévérance et l'obstination pour réaliser ce travail. J'exprimons mes profonds remerciements à mon encadreur, le monsieur CHERGUI Abdelmalek, professeur à l'Ecole National Polytechnique, pour l'aide qu'il m'a apportée, pour sa patience, sa confiance, son encouragement, et son œil critique qui m'a été très précieux pour structurer le travail et pour améliorer la qualité des différentes sections de ce mémoire, je le remercie vivement.

Je tiens à remercier tous les enseignants qui ont contribué à ma formation et je cite en particulier Monsieur KERBACHI Rabah, Professeur l'Ecole Nationale Polytechnique, qui m'a fait l'honneur aussi de présider ce jury de ma soutenance.

Je tiens à remercier vivement Madame AROUA, Docteur à l'école nationale polytechnique pour avoir acceptée de consacrer de son temps pour examiner ce travail.

Enfin, une pensée concerne bien évidemment tous mes proches, mes amis et en particulier, mes parents, mes frères et ma sœur et toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réussite de ce projet.

Merci à tous.

## الملخص

تعتبر المبيدات واحدة من الملوثات السامة للأوساط البيئية.

يتمثل هذا العمل في حوصلة حول تحليل بقايا المبيدات في الوسائط الغذائية بصفة عامة وفي المياه بصفة خاصة وذلك من خلال استخلاصها بطريقة الكويشرز ثم تمريرها بجهاز الكروماتوغرافيا السائلة الموصولة بالطيف الكتلي المزوج من أجل التحليل النوعي والكمي لعينات المبيدات.

**كلمات البحث:** جهاز الكروماتوغرافية السائلة الموصولة بالطيف الكتلي المزوج، الإستخلاص بطريقة الكويشرز، المبيدات، الوسائط الغذائية، المياه.

### Abstract:

Pesticides are toxic pollutants in the environment.

This work is a discription of the analysis of multiple pesticide residues in food matrices and particularly in water. Through extraction method Quechers and then the identification and quantitation by liquid chromatography coupled to mass spectroscopy in tandem

**Key words:** Pesticides; liquid chromatography coupled to mass spectroscopy in tandem; Extraction by Quechers method; food matrices; Waters.

### Résumé :

Les pesticides sont des polluants toxiques dans l'environnement.

Ce travail est une description des différentes étapes allant de l'extraction par la méthode de QueChERS et puis de l'identification et la quantification par la chromatographie en phase liquide couplé à la spectroscopie de masse en tandem des multi résidus de pesticides dans les matrices alimentaires et dans l'eau.

**Mots clés :** pesticides, chromatographie en phase liquide couplé à la spectroscopie de masse en tandem ; Extraction par la méthode de QueChERS ; matrices alimentaires, Eaux.

## Table des matières

Liste des tableaux .....	6
Liste des figures .....	7
Liste des abréviations .....	8
Introduction .....	10
1. Généralités sur les pesticides .....	13
1.1. Définition : .....	13
1.2. Classification des pesticides: .....	13
1.2.1. Premier système de classification.....	13
1.2.2. Deuxième système de classification .....	14
1.3. Les pesticides dans les eaux .....	15
1.3.1. Transfert vers les eaux souterraines : le lessivage .....	16
1.3.2. Transfert vers les eaux de surface : le ruissellement.....	16
1.4. Impact sur l'environnement .....	17
1.4.1. Impact sur l'homme .....	17
1.4.2. Impact sur l'écosystème aquatique .....	17
1.5. Réglementation : .....	18
2. La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem pour l'analyse des pesticides .....	20
2.1. Introduction.....	20
2.2. La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem LC-MS/MS .....	21
2.2.1. La chromatographie en phase liquide.....	21
2.2.2. La spectrométrie de masse.....	22
2.2.3. La source d'ionisation à pression atmosphérique (API).....	23
2.2.4. Les analyseurs .....	25
2.2.5. La spectrométrie de masse en tandem .....	26
2.3. Conditions opératoires pour extraction des pesticides : .....	28
2.3.1. Extraction par La technique QuEChERS.....	28
2.3.1.3. Protocole proposé pour la méthode QuEChERS [29] : .....	29
2.4. Conditions opératoires pour l'analyse des pesticides dans la LC-MS/MS : .....	29
Conclusion générale.....	31
Références bibliographiques .....	32

## Liste des tableaux :

Tableau 1- 1 LES valeurs des LMR pour l'eau de consommation HUMAINE EN Algérie [32]	18
---	----

## Liste des figures :

Figure 1- 1 Structures chimiques des principales familles de pesticides.....	15
Figure 1- 2 Processus de dissipation des pesticides dans l'environnement [6].....	16
Figure 2- 1 Appareillage de la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.....	21
Figure 2- 2 Schéma d'un spectromètre de masse.....	23
Figure 2- 3 Choix de la source d'ionisation.....	24
Figure 2- 4 Principe d'ionisation par HESI.....	25
Figure 2- 5 Schéma d'un triple quadripôle.....	26
Figure 2- 6 Modes d'acquisition Full scan et SIM.....	27
Figure 2- 7 Mode d'acquisition « SRM ».....	28
Figure 2- 8 Chromatogramme d'un mélange des pesticides [29].....	30

# Liste des abréviations

**APCI**: Atmospheric Pressure Chemical Ionization

**API**: Atmospheric Pressure Ionization

**APPI**: Atmospheric Pressure PhotoIonisation

**C18**: Column *Octadecyl*

**CID** : Chemical Induced Dissociation

**CPL** : Chromatographie en Phase Liquide

**CPL/MS** : Chromatographie en Phase Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse

**ESI** ElectroSpray Ionisation

**ESP**: ElectroSPray

**eV**: electro Volte

**F**: Fongicide

**FAB**: Fast Atom Bombardment

**GC**: Gaz Chromatography

**HESI**: *Heated Electrospray Ionization*

**HPLC** High Performance Liquid Chromatography

**IPRLC**: Ion Reversed Phase Liquid Chromatography

**LC** : Liquid Chromatography

**LC-MS/MS** : Chromatographie en phase Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse en tandem

**LOD**: Limit Of Detection

**MRM**: Multiple Reaction Monitoring

**MS**: Mass Spectrometry

**SM<sup>2</sup>** :Spetrométrie de masse en tandem

**MS/MS**: Mass Spectrometry/Mass spectrometry

**m/z** : Mass/charge

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**P<sub>atm</sub>** : Pression atmosphérique

**pH** : *Potentiel hydrogène*

**ppm** : *partie par million*

**Q** : Quadripôle

**rpm**: Rotation par minute

**SIM**: Selected Ion Monitoring

**SPE**: Solid Phase Extraction

**SPME**: Solid Phase Micro-Extraction

**SRM**: Selected Reaction Monitoring

**UPLC:** Ultra Performance Liquid Chromatography

**UV-DAD :** Détecteur *Ultra-Violet* à barrette de diodes.

# INTRODUCTION

Les pesticides, encore appelés produits phytosanitaires, sont des substances chimiques utilisées pour la croissance, la protection et la conservation des végétaux. Dès la fin de la seconde guerre mondiale, ces produits furent très employés dans le secteur agricole non seulement afin d'augmenter les rendements de production mais également dans le but de protéger les plantes tout au long de leur développement.

De nombreux travaux ont démontré la présence et la persistance de pesticides 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 croît constamment et les niveaux auxquels ces composés doivent être déterminés sont de plus en plus faibles. Il est donc devenu nécessaire de développer des méthodes analytiques capables de détecter et de quantifier ces molécules à de très faibles teneurs.

Les résidus de pesticides sont très souvent analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à différents détecteurs. Mais avec les progrès de la recherche et de l'industrie phytosanitaire, les pesticides sont devenus moins volatils, plus thermolabiles et de plus en plus polaires. Par conséquent, leur analyse par CPG nécessite une étape préalable de dérivation, source potentielle de pollution, d'erreur et d'incertitude dans le résultat de la mesure. En revanche, l'analyse par chromatographie en phase liquide (CPL) s'avère bien adaptée aux propriétés physico-chimiques de la majorité des composés actuellement recherchés. Ainsi, associée à la spectrométrie de masse, cette technique s'est imposée comme un outil analytique de choix dans le domaine de l'analyse multi résidus de pesticides. Par

ailleurs, la mise en œuvre de cette technique après une étape de traitement et extraction des pesticides de l'échantillon judicieusement choisie permet d'atteindre des seuils de quantification compatibles avec ceux définis par la réglementation.

Pour améliorer l'efficacité des méthodes traditionnelles, une nouvelle approche de préparation des échantillons a été présentée par Anastassiades et al [1]. Cette procédure connue sous le nom « QuEChERS » utilise une seule extraction dans l'acétonitrile et nécessite une très faible quantité d'échantillon, un grand excès de sels ou tampons sont ajoutés à l'extrait pour faciliter l'extraction des deux pesticides polaires et non polaires.

Dans le cadre de notre mémoire de master, nous allons présenter la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem utilisée pour l'analyse des résidus des pesticides dans les matrices alimentaires et dans l'eau en utilisant la méthode d'extraction "QuEChERS".

***Chapitre 1 :***

**Généralités sur les pesticides**

# 1. Généralités sur les pesticides

## 1.1. Définition :

Les pesticides ou produits phytosanitaires, sont définis comme des substances dont les propriétés chimiques contribuent à la protection des plantes cultivées et des produits récoltés des attaques de champignons, parasites, d'insectes, d'acariens, de rongeurs champêtres ou encore à détruire les adventices ou « mauvaises herbes » [2]. Ce sont des formulations contenant une ou plusieurs substances chimiques minérales ou organiques, synthétiques ou naturelles. Les formulations sont composées en générale d'une ou de plusieurs substances actives et d'un ou de plusieurs adjuvants. La substance active exerce une action générale ou spécifique sur les organismes nuisibles ou sur les végétaux ; c'est elle qui confère au produit l'effet désiré. L'adjuvant quant à lui est une substance dépourvue d'activité biologique jugée suffisante dans la pratique mais capable de modifier les propriétés physiques, chimiques ou biologiques des produits phytosanitaires. Il renforce l'efficacité, la sécurité du produit et sa facilité d'utilisation [3].

Dans de nombreux domaines, le terme « résidus de pesticides » est largement employé ; il correspond aussi bien à la substance active elle-même qu'à ses produits de dégradation qui peuvent être présents à la fois dans l'environnement mais aussi dans des produits de consommation.

## 1.2. Classification des pesticides:

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. D'une manière générale, les substances actives peuvent être classées soit en fonction de la nature de l'espèce à combattre (1er système de classification), soit en fonction de la nature chimique de la principale substance active qui les composent (2eme système de classification).

### 1.2.1. Premier système de classification

Le premier système de classification repose sur la cible à contrôler. Il existe principalement trois grandes familles d'activités que sont les herbicides, les fongicides et les insecticides.

#### a. Les herbicides

Représentent les pesticides les plus utilisés dans le monde, toutes cultures confondues. Ils sont destinés à éliminer les végétaux rentrant en concurrence avec les plantes à protéger en ralentissant leur croissance. Les herbicides possèdent différents modes d'action sur les

plantes, ils peuvent être des perturbateurs de la régulation d'une hormone, « l'auxine » (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 aminés.

b. Les fongicides

Permettent quant à eux de combattre la prolifération des maladies des plantes provoquées par des 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 stéroïdes, des acides aminés, des protéines ou le métabolisme des glucides.

c. Les insecticides

Ils sont utilisés pour la protection des plantes contre les insectes. Ils interviennent en les éliminant ou en empêchant leur reproduction, différents types existent : les neurotoxiques, les régulateurs de croissance et ceux agissant sur la respiration cellulaire. Outre, ces trois grandes familles mentionnées précédemment, d'autres peuvent être citées en exemple : les acaricides, contre les acariens ; les nématicides, contre les vers du groupe des nématodes ; les rodenticides, contre les rongeurs ; les taupicides, contre les taupes ; les molluscicides, contre les limaces et escargots ou encore les corvicides et corvifuges, respectivement contre les corbeaux et les autres oiseaux ravageurs de culture.

### 1.2.2. Deuxième système de classification

Le deuxième système de classification tient compte de la nature chimique de la substance active qui compose majoritairement les produits phytosanitaires. Compte tenu de la variété des propriétés physico-chimiques des pesticides disponibles sur le marché, il existe un très grand nombre de familles chimiques. Les plus anciens et principaux groupes chimiques sont les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, les triazines et les urées substituées. Ce deuxième système de classification ne permet pas de définir de manière systématique un composé. Certains pesticides peuvent, en effet, être composés de plusieurs fonctionnalités chimiques. Ils peuvent alors être classés dans une ou plusieurs familles chimiques (Figure 1-1).

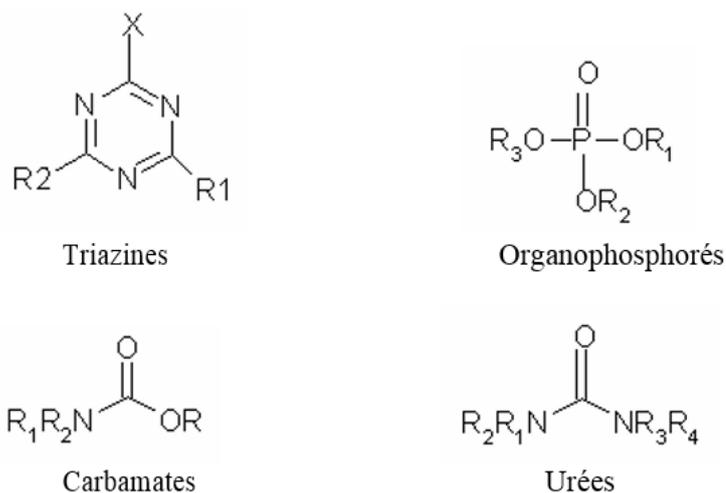


Figure 1- 1 Structures chimiques des principales familles de pesticides.

### 1.3. Les pesticides dans les eaux

Malgré un souci de protection de l'environnement constant et croissant lors de l'utilisation des pesticides, il y a toujours une forte partie qui n'atteint pas sa cible, la plante à protéger et qui se retrouve dans les divers compartiments de l'environnement non cibles. La dose de pesticides appliquée efficacement sur la plante à traiter est comprise entre 0 et 23% de la quantité totale épanchée, et elle peut varier suivant les propriétés physicochimiques de la molécule et d'autres facteurs externes concernant essentiellement les pratiques culturales (mode d'épandage) et les facteurs climatiques [4]. La grande part de la substance active apportée qui n'atteint pas sa cible sera alors susceptible, à plus ou moins long terme, d'être transférée vers les eaux au terme d'un certain nombre de processus (Figure 1-2) : la volatilisation dans l'atmosphère, la dérive, la rétention et l'adsorption dans le sol, le ruissellement à la surface et le lessivage dans la profondeur du sol [5]. Les processus de dégradation (biodégradation et photodégradation) et la décomposition chimique jouent également un rôle dans la contamination environnementale et aquatique.

L'introduction des pesticides dans l'environnement aquatique peut se faire soit de manière directe, soit de façon indirecte.

L'introduction directe est en général ponctuelle et peu fréquente ; elle peut résulter d'un accident mais aussi correspondre à une démolition du milieu, un traitement de cultures inondées ou situées en bordure d'un cours d'eau. Le cas général reste quand même celui d'une introduction indirecte liée au traitement d'une zone éloignée du milieu aquatique.

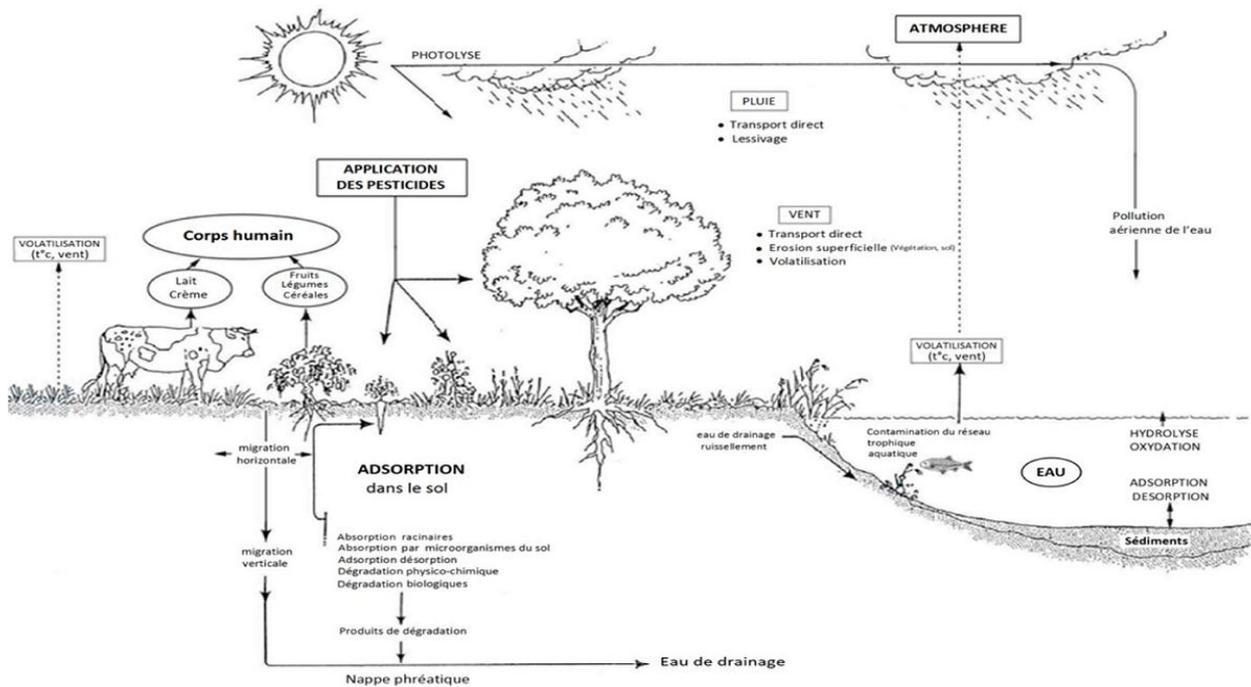


Figure 1- 2 Processus de dissipation des pesticides dans l'environnement [6]

### 1.3.1. Transfert vers les eaux souterraines : le lessivage

Le processus de lessivage des pesticides correspond au transfert des molécules de la surface du sol, ou des couches superficielles du sol, vers les eaux de profondeur (nappe phréatique), soit de la zone non saturée à la zone saturée du sol. Ce transfert se fait essentiellement via la dilution des pesticides dans la solution du sol. Deux types de transfert sont à différencier, le transfert matriciel où la percolation de l'eau dans le sol entraîne la lixiviation des molécules. La vitesse de transfert dépend alors des caractéristiques de la molécule, des propriétés du sol, de la vitesse d'infiltration et de l'épaisseur de la zone non saturée, décrite par l'équation de convection dispersion. Le deuxième type de transfert des pesticides de la surface vers la zone saturée est le transfert préférentiel. Ce dernier peut être décrit comme un transfert vertical rapide de la solution du sol via la macroporosité ce qui peut aggraver la contamination des eaux souterraines, le temps de dissipation des pesticides dans le sol étant alors limité [7]. L'écoulement préférentiel engendrerait la présence de molécules difficilement lessivables dans les eaux souterraines [8]. La modélisation des transferts préférentiels est encore limitée de par la difficile estimation de la présence et du rôle exacte des macropores dans ce processus.

### 1.3.2. Transfert vers les eaux de surface : le ruissellement

Le transfert de produits phytosanitaires vers les eaux de surface se fait essentiellement

par ruissellement. Les produits phytosanitaires vont pouvoir être transportés de plusieurs façons : en solution dans l'eau qui ruisselle, en suspension ou accrochés à des particules de sol qui sont arrachées par l'eau qui ruisselle [5]. Il existe deux sortes de ruissellement : le ruissellement hortonien qui est le fait d'un dépassement de la capacité d'infiltration du sol et le ruissellement hypodermique ou écoulement de sub-surface, qui se produit lorsque la conductivité latérale est plus importante que la conductivité verticale.

#### 1.4. Impact sur l'environnement

L'ensemble de la communauté scientifique s'accorde sur le danger et la nocivité des produits phytosanitaires et de leurs métabolites dans l'environnement.

##### 1.4.1. Impact sur l'homme

L'homme et les animaux en général, absorbent les pesticides et leurs produits dérivés via la nourriture, l'eau, par contact avec la peau et les cuticules, ou encore par inhalation. Une étude conduite aux Etats Unis a mis en évidence la présence de résidus de pesticides dans différentes matrices tels que l'urine, le sang, les tissus adipeux et même le lait maternel [9].

En dépit de leur sélectivité et mode d'action spécifique, les pesticides exercent leur nocivité envers les organismes involontairement exposés, suite à la contamination de l'environnement et de la chaîne alimentaire. Les résultats issus de différentes études indiquent que les pesticides sont cytotoxiques, neurotoxiques, embryotoxiques, mutagènes, tératogènes ou carcinogènes. Ils exercent leur action toxique par génotoxicité directe, ils peuvent donc subir une activation métabolique et former des intermédiaires électrophiles capables d'interagir avec les acides nucléiques ; ou par d'autres moyens indirects tel que le stress oxydatif, l'inhibition de la communication intercellulaire, la formation de récepteurs activés ou autres.

##### 1.4.2. Impact sur l'écosystème aquatique

Les voies de transfert et les propriétés des substances conditionnent l'état (dissous ou adsorbé à des particules) dans lequel les pesticides arrivent dans les milieux aquatiques. La forme chimique des molécules peut fortement conditionner leur biodisponibilité et donc fréquemment leur toxicité pour les organismes aquatiques. Tous les groupes d'organismes aquatiques ne sont pas exposés de la même façon, en fonction de leurs caractéristiques anatomiques, physiologiques et écologiques (habitat, ressources alimentaires utilisées, etc.). Quelle que soit la substance, les conséquences de l'exposition sur les organismes aquatiques peuvent découler d'effets directs ou indirects, ou de la combinaison des deux types d'effets. Au sein des écosystèmes, les effets directs des pesticides affectent les quatre compartiments de l'environnement aquatique : producteurs primaires, zooplancton

macrobenthos, poissons et amphibiens [10]. Les effets toxiques directs peuvent entraîner des modifications des interactions biologiques et de divers processus qui impliquent des espèces qui sont moins sensibles à ces substances. Ces modifications sont appelées effets secondaires ou indirects [11]. Ces effets reposent essentiellement sur une modification des relations de compétition au sein d'un même niveau trophique et/ou des relations de consommation entre des niveaux trophiques successifs. Certains de ces effets ont parfois été observés dans des écosystèmes aquatiques naturels, mais les données valides à ce propos sont rares. Les études des impacts possibles des pesticides sur les organismes vivants nécessitent des mesures fiables des niveaux d'exposition de ces organismes pour faire évaluer le lien entre les effets biologiques mesurés et la contamination des milieux par les pesticides.

### 1.5. Règlementation :

La limite maximale de résidus (LMR) est la concentration maximale d'un résidu qui est légalement autorisée ou reconnue comme acceptable dans ou sur un aliment ou un produit agricole ou aliments pour les animaux [30]. Les limites maximales de résidu (LMR) sont établies par couple substance « active-denrée » à partir des données toxicologiques et agronomiques. Elles sont exprimées en milligrammes de pesticides par kilogramme de denrée (mg/kg). Les LMR sont définies au niveau international, européen et national [31]. Quelques valeurs de *LMR* dans la réglementation nationale sont illustrées dans le tableau 1-1 :

Tableau 1- 1 LES valeurs des LMR pour l'eau de consommation HUMAINE EN Algérie [32]

Les pesticides	LMR (µg/L)
Pesticides par substance individualisée - Insecticides organochlorés persistants, organophosphorés et carbamates, les herbicides, les fongicides, les P.C.B. et P.C.T	0,1
Aldrine et dieldrine	0,03
Pesticides (Totaux)	0.5

## Chapitre 2 :

La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem pour l'analyse des pesticides

## 2. La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem pour l'analyse des pesticides

### 2.1. Introduction

Le couplage de la CPL avec un détecteur UV a été longtemps utilisé mais cette technique n'est pas suffisamment spécifique ni sélective à cause de la ressemblance des spectres UV des pesticides d'une même famille chimique. D'autre part, la technique manque de sensibilité pour l'analyse de traces de composés présents dans des matrices complexes plus sensible et sélective que l'absorption UV, la détection par fluorescence peut être une alternative intéressante. Cependant, elle s'applique uniquement aux analytes qui possèdent des fluorophores.

Associée à la spectrométrie de masse (SM), la CPL s'est imposée comme un outil analytique de choix dans ce domaine. Outre la complexité du phénomène d'ionisation, ce couplage présente quelques difficultés analytiques à surmonter. La plus importante provient des spectres de masse qui contiennent, en général uniquement l'ion moléculaire. L'ion adduit ou un ion issu d'une très faible fragmentation [12]. La co-élution de composés interférents provenant de la matrice peut alors gêner le processus de détection : au même temps de rétention, les composés qui forment des ions de même rapport  $m/z$  sont indifférenciés et peuvent mener à de faux positifs. Le degré de confiance d'identification des composés par une détection par SM se trouve alors affaibli. Le risque d'erreur et de ce fait l'incertitude des analyses augmentent dans les cas suivants : une haute complexité de la matrice ou du produit à analyser et un grand nombre de pesticides à détecter en une seule analyse. Ces aspects sont en général présents lors de l'analyse de résidus de pesticides dans des matrices alimentaires. Pour ces raisons, la mise en œuvre d'une détection par SM est souvent limitée aux matrices propres, à la détermination d'un nombre limité de composés et implique l'exploitation maximale du pouvoir séparatif de la chromatographie.

La simple spectrométrie de masse souffre aussi de l'importance du bruit de fond dû à la matrice de l'échantillon et aux clusters issus des solvants de la phase mobile. Le bruit de fond observé lors de l'analyse d'échantillon réel empêche l'obtention de basses limites de quantification.

Ces limitations ont été dépassées avec le développement de la CPL couplée à la SM en tandem (SM<sup>2</sup>) qui améliore les méthodes traditionnelles de spectrométrie de masse avec deux étapes d'analyses de masse.

## 2.2. La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem LC-MS/MS

Grace à sa sensibilité et de sa sélectivité, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse tandem (LC-MS/MS) est considérée comme « le gold standard » pour la quantification de composés dans des milieux complexes [14].

Les composés de l'échantillon vont dans un premier temps être séparés par chromatographie liquide suivant leur hydrophobicité. Ils arrivent séquentiellement dans la source du spectromètre de masse et vont être ionisés. Dans un deuxième temps, les substances vont être analysées dans le spectromètre de masse. Celui-ci permet de mesurer la masse des différentes ions (MS simple) et de fragmenter ces mêmes (spectres MS-MS) pour accéder à la structure de ces derniers [15].

Les constituants d'un système de chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem sont illustrés dans la figure 2-1 :



Figure 2- 1 Appareillage de la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

- (1) : Chromatographe en phase liquide Thermo Scientific Accela™ UPLC ;
- (2) et (3) : échantillonneur automatique ;
- (4) : Pompe ;
- (5) : Colonne chromatographique C18 Thermo Scientific « Hypersil GOLD » (100mm ;2,1mm ; 1,9µm),
- (6) : Spectromètre de masse Thermo Scientific TSQ QUANTUM Access muni d'une source d'ionisation electrospray chauffée (HESI) ;
- (7) : Enregistreur.

### 2.2.1. La chromatographie en phase liquide

Elle est l'un des outils analytiques les plus performants, ce qui lui procure la possibilité d'être

utilisée dans des domaines très variés. Elle permet la séparation, l'identification et la quantification des composés à l'état liquide ou dissous. Cette méthode présente l'avantage de ne causer aucune détérioration des produits thermolabiles.

Elle utilise une phase mobile constituée d'un solvant unique, ou le plus souvent d'un mélange de solvants plus ou moins complexe, caractérisé par une grande pureté. Cette phase mobile est introduite au niveau de la colonne contenant la phase stationnaire par un système de pompage à débit constant. La séparation est fondée sur la distribution des solutés entre deux phases non miscibles. En effet, alors que la phase mobile tend à entraîner les espèces à séparer dans un mouvement, la phase stationnaire, elle, tend à les retarder. Cette rétention est d'autant plus forte, que les interactions mises en jeu sont plus intenses, nombreuses et plus énergétiques. Il en résulte que les analytes ont, pour la plupart, des vitesses de déplacement différentes et inférieures à celle de la phase mobile, d'où la notion de rétention et la possibilité de séparations. Couplé à un système de détections en continu au niveau du chromatographe, un tel instrument permet d'avoir des résultats, à la fois qualitatifs et quantitatifs [16].

### 2.2.2. La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui repose sur l'action d'un champ électromagnétique sur une particule chargée afin d'en déterminer le rapport masse/charge  $m/z$  [17]. Cette technique permet l'identification de molécules d'intérêt par transformation des molécules en ions. Un spectromètre de masse est composé de différents éléments : la source d'ionisation, l'analyseur, le détecteur et l'enregistreur. La source permet l'ionisation de l'échantillon à analyser et le transfert des ions vers l'analyseur de l'instrument. Ce dernier trie en suite les ions en fonction de leur rapport  $m/z$ . Enfin le détecteur collecte les ions à la sortie de l'analyseur en leur associant leur rapport  $m/z$  et une intensité. L'enregistreur permet de traiter le signal et de convertir les informations en spectre de masse et/ou en chromatogramme lors d'un couplage avec une technique chromatographique [17,18].

Les principaux composants d'un spectromètre de masse sont illustrés dans (la figure 2-2)[19]  
:

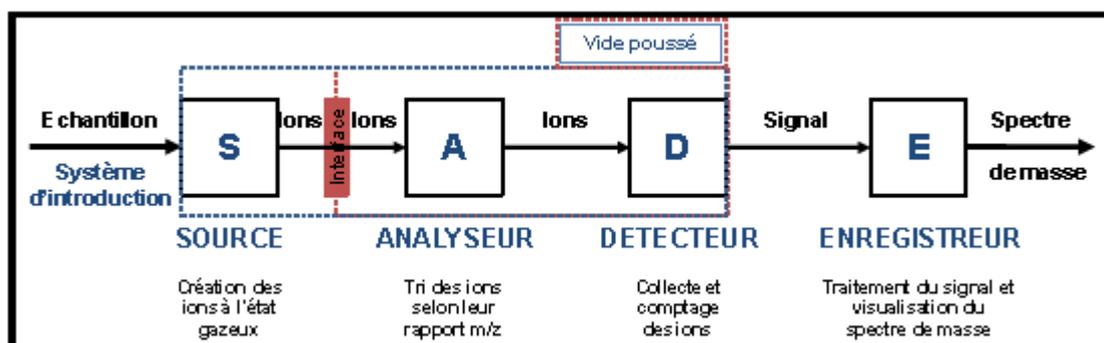


Figure 2- 2 Schéma d'un spectromètre de masse

Afin de limiter le risque de collisions avec des particules de gaz résiduelles qui entraîneraient des déviations dans la trajectoire de l'ion, le spectromètre de masse fonctionne sous un vide poussé de l'ordre de  $10^{-6}$  à  $10^{-7}$  torr [20]. Cependant, en fonction de l'appareil, la source d'ionisation peut être sous vide ou à pression atmosphérique API. Ces dernières possèdent alors une interface permettant le passage de la pression atmosphérique à un vide poussé au niveau de l'analyseur.

### 2.2.3. La source d'ionisation à pression atmosphérique (API)

La source est l'élément du spectromètre qui permet l'évaporation et l'ionisation des analytes contenus dans l'échantillon. Plusieurs méthodes d'ionisation sont disponibles et leur choix d'utilisation dépend des propriétés physico-chimiques des molécules à étudier et des renseignements désirés.

Les sources d'ionisations à pressions atmosphériques API ont permis de s'affranchir ou de limiter les différents problèmes existants lors de l'utilisation d'autres interfaces. Elles ont percé le couplage CPL/MS et ont révolutionné l'analyse des pesticides par cette technique.

Plusieurs sources API existent et parmi eux la source d'ionisation electrospray ESI, la source d'ionisation electrospray chauffée H-ESI, la source d'ionisation chimique à pression atmosphérique APCI.

Les deux facteurs déterminants pour le choix de la source sont la polarité et la taille moléculaire du composé à analyser. D'une manière générale, l'ESI requiert des ions préformés en solution, ce qui la rend ainsi mieux adaptée à l'analyse des composés polaires. On pourrait aussi l'utiliser pour analyser des composés de haut poids moléculaire (comme les peptides et les protéines) car ces composés sont moins aptes à supporter les hautes températures de vaporisation de l'APCI. L'ESI peut en outre générer des composés multi-protonés qui deviennent ainsi observables alors que leur taille dépasse le domaine de masse

de l'analyseur. En APCI, il n'est pas nécessaire d'avoir un ion préformé, ce qui permet d'analyser des composés apolaires en obtenant de bien meilleurs résultats [21,22].

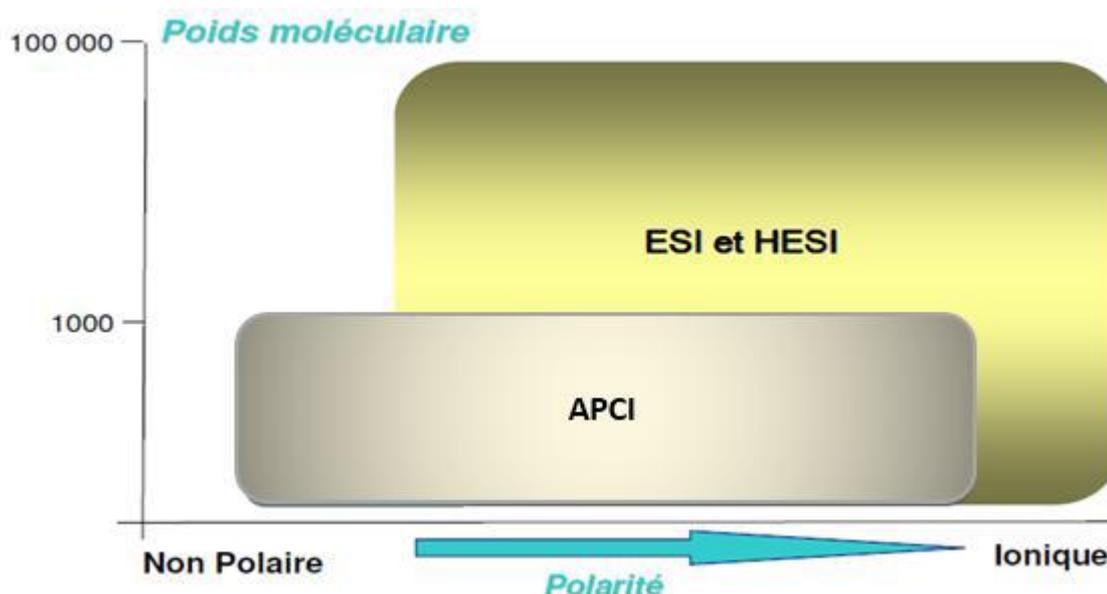


Figure 2- 3 Choix de la source d'ionisation

Dans le domaine d'analyse des pesticides, le choix entre les interfaces ESI, HESI et APCI n'est pas aisé. Cependant, au vu du nombre d'applications l'HESI reste l'interface la plus adaptée [17].

L'ionisation par electrospray à chaud (H-ESI) transforme les ions présents dans la solution en ions en phase gazeuse grâce à l'utilisation combinée de l'ionisation electrospray (ESI) et d'un gaz auxiliaire chauffé. Le mode H-ESI permet d'analyser tout composé polaire qui produit un ion préformé en solution.

Les composés basiques (les amines, par exemple) peuvent former une molécule protonée  $[M + H]^+$ , tandis que les composés acides (les acides sulfoniques, par exemple) peuvent former une molécule déprotonée  $[M - H]^-$ . En H-ESI, les ions sont produits et introduits dans le spectromètre de masse de la façon suivante :

- L'échantillon pénètre dans l'aiguille ESI sur laquelle une tension élevée est appliquée.
- L'aiguille H-ESI vaporise l'échantillon en fines gouttelettes chargées électriquement en surface.
- La densité de la charge électrique à la surface des gouttelettes augmente à mesure que le solvant s'évapore.
- La densité de la charge électrique à la surface des gouttelettes augmente jusqu'à un seuil critique appelé limite de stabilité de Rayleigh. Lorsque ce point critique est atteint,

les gouttelettes se subdivisent en gouttelettes plus petites car la répulsion électrostatique est supérieure à la tension de surface des gouttelettes. Ce processus est répété plusieurs fois jusqu'à l'obtention de minuscules gouttelettes.

- La répulsion électrostatique éjecte, en phase gazeuse les ions d'échantillon des minuscules gouttelettes hautement chargées.
- Les ions d'échantillons pénètrent alors dans le spectromètre de masse via le tube de transfert des ions [23, 24].

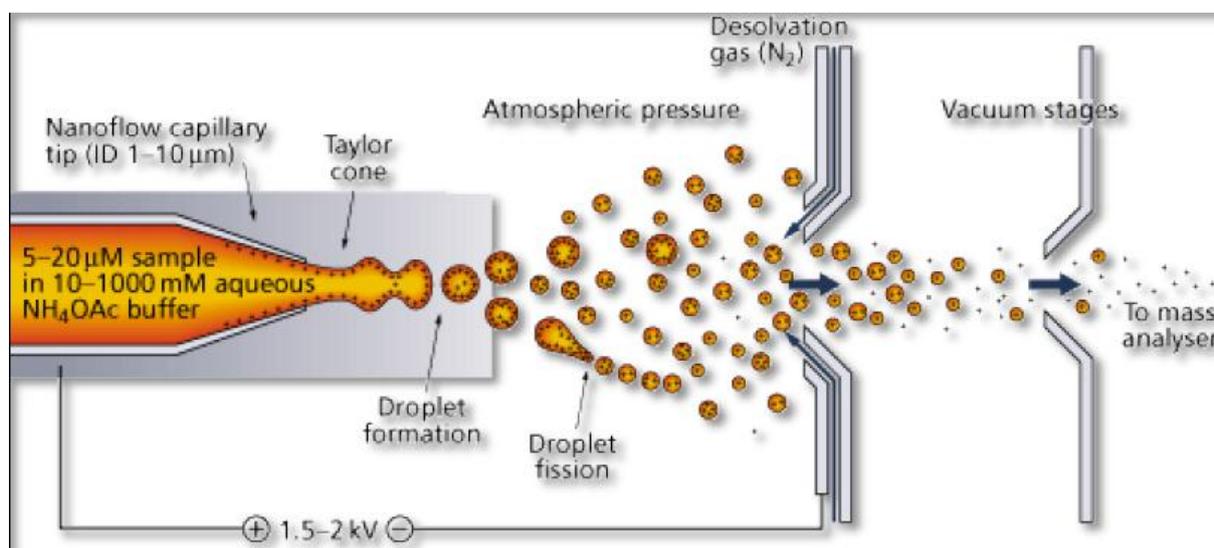


Figure 2- 4 Principe d'ionisation par HESI

#### 2.2.4. Les analyseurs

L'analyseur de masse correspond à la partie du spectromètre de masse qui sépare les ions formés dans la source en fonction de leur rapport  $m/z$ . Plusieurs types d'analyseurs sont disponibles. Leur mode de fonctionnement repose sur l'utilisation de champs électriques et/ou magnétiques.

Parmi les analyseurs basse résolution qui peuvent être couplés aux sources d'ionisation à pression atmosphérique et utilisés dans le domaine de l'analyse de pesticides, on trouve l'analyseur quadripolaire [21].

Un filtre de masse quadripolaire est constitué successivement d'une série de lentilles électroniques permettant la convergence et l'accélération des ions sortant de la source, puis d'un quadripôle formé le plus communément de quatre barres entre lesquelles sont établies des différences de potentiels, l'ensemble débouchant sur un détecteur. L'ion entrant dans le quadripôle est soumis à l'influence d'un champ électrique total, constitué d'un champ alternatif quadripolaire superposé à un champ constant, résultant de l'application sur les

barres, deux à deux, des potentiels  $+(U - V \cdot \cos \Omega t)$  et  $-(U - V \cdot \cos \Omega t)$ , où  $U$  est la tension continue (en volt),  $V$  et  $\Omega$  respectivement l'amplitude de la tension alternative (en volt) et la pulsation de radiofréquence [25].

### 2.2.5. La spectrométrie de masse en tandem

La spectrométrie de masse en tandem est née de la volonté d'obtenir des informations structurales sur les molécules ionisées par des techniques dites douces. En effet, pour des techniques d'ionisation dures, telles que l'ionisation électronique qui apporte assez d'énergie interne aux molécules pour se fragmenter, une seule analyse en masse permet d'obtenir de nombreuses informations structurales et d'élucider la structure de la molécule. En revanche, les techniques d'ionisation douces génèrent essentiellement dans la source des espèces protonées ou déprotonées avec pas ou peu de fragmentation. Les informations structurales apportées par une analyse en masse unique sont donc très limitées. L'idée a été de trouver un moyen d'exciter hors de la source les ions stables afin d'accroître leur énergie interne et, ainsi, de les faire fragmenter [26].

La MS/MS est l'acquisition et l'étude du spectre des produits ou précurseurs électriquement chargés d'un ou plusieurs ions de rapport  $m/z$  sélectionnés, ou d'ions précurseurs d'une perte de masse neutre sélectionnée.

Les appareillages « tandem » sont construits de la manière suivante : une première étape consiste à sélectionner un ion stable particulier issu de la source d'ions (appelé « parent » ou « précurseur ») et une seconde qui représente l'analyse des ions issus de sa décomposition (ions « fils » ou « produits »). Dans la phase intermédiaire se situe l'activation de l'ion précurseur qui conduit à son excitation (augmentation de son énergie interne) et à sa fragmentation.

Cette technique peut être accomplie par des instruments à faisceaux d'ions comportant plus d'un analyseur, exemple : le triple quadripôle, qui est l'association de trois quadripôles en série. Ce dispositif permet après la sélection d'un ion par le premier quadripôle de le fragmenter dans le deuxième et d'analyser les ions fils apparus dans le troisième [27].

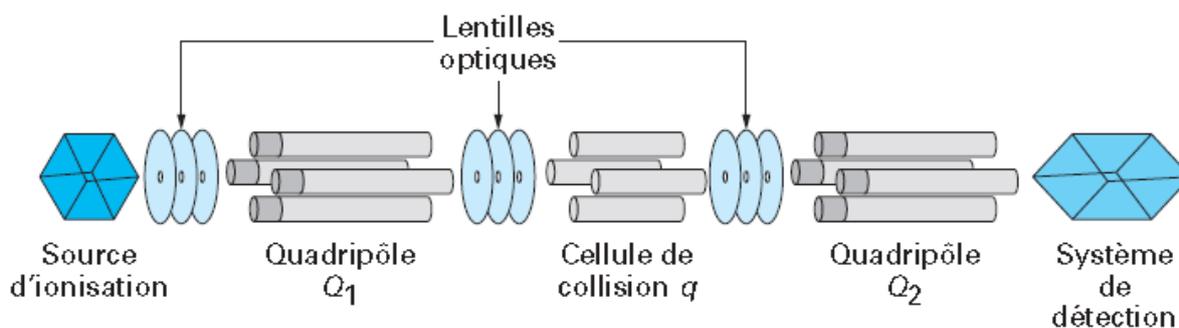


Figure 2- 5 Schéma d'un triple quadripôle

Pour exciter l'ion précurseur, plusieurs méthodes d'activation à faibles et hautes énergies sont disponibles, mais le procédé d'activation MS/MS le plus utilisé en employant un analyseur de type triple quadripôle est ce qu'on appelle la dissociation induite par collision (CID).

Ce processus se déroule en deux étapes, la première comprend l'excitation de l'ion précurseur en faisant entrer en collision la molécule d'analyte avec un gaz cible (un gaz lourd « Ar, Xe » de même qu'une pression élevée permettant d'augmenter le rendement de fragmentation) qui correspond à une certaine énergie. Cette dernière est l'énergie de collision suivie, d'une deuxième étape qui consiste à la dissociation unimoléculaire de l'ion dont la fragmentation aura lieu si et seulement si l'énergie apportée par la collision est suffisamment élevée pour l'exciter au-delà de son seuil de dissociation.

En spectrométrie de masse, différents modes d'acquisitions sont disponibles. Le mode balayage (« full scan ») qui permet la détection de tous les ions produits dans la source et le mode d'acquisition d'un rapport  $m/z$  donné (« SIM, Single Ion Monitoring »), qui permet de détecter spécifiquement un ou plusieurs ions. Ses modes sont disponibles sur des analyseurs de type simple quadripôle et peuvent donc être effectués avec les quadripôles Q1 ou Q3 [19].

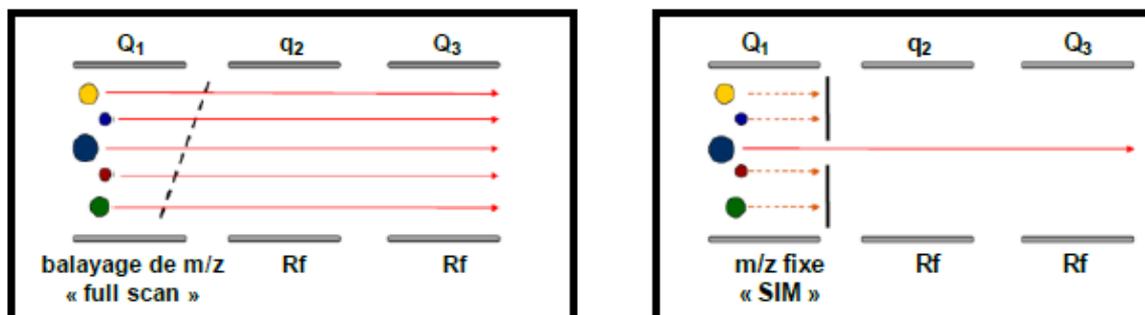


Figure 2- 6 Modes d'acquisition Full scan et SIM

La combinaison de ces deux modes permet de réaliser 4 types de procédures d'acquisitions qui sont utilisés en spectrométrie de masse en tandem.

Le mode balayage de plusieurs ions de fragmentation (« MRM, Multiple Reaction Monitoring », ou « SRM, Single Reaction Monitoring ») est obtenu en faisant fonctionner les quadripôles Q1 et Q3 en mode SIM. Il permet de suivre un ion produit spécifique d'une fragmentation particulière de l'ion précurseur (transition), comme il est possible de suivre plusieurs transitions au cours d'une même analyse [19].

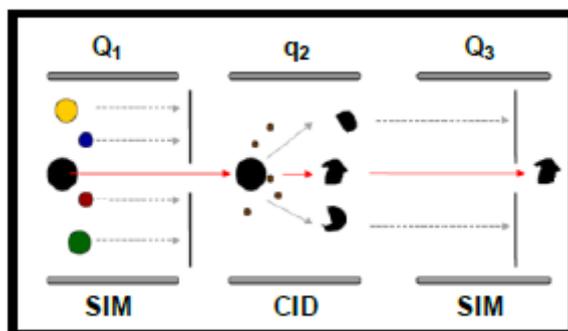


Figure 2- 7 Mode d'acquisition « SRM »

## 2.3. Conditions opératoires pour extraction des pesticides :

### 2.3.1. Extraction par La technique QuEChERS

#### 2.3.1.1. Définition :

La technique QuEChERS a été nommée en fonction des avantages qu'elle apporte : rapide, facile, abordable, efficace, robuste et sécuritaire (*Quick, Easy, Cheap, Efficient, Rugged and Safe*).

Cette technique simplifie grandement l'analyse des résidus de plusieurs pesticides dans les fruits, les légumes, les céréales et leurs dérivés.

En raison de sa grande simplicité, cette technique laisse place à peu d'erreurs de manipulation. C'est donc pourquoi elle permet d'obtenir des rendements élevés et des analyses précises.

Le but de cette technique n'est pas simplement de réduire les coûts liés à la séparation des pesticides, mais aussi de réduire la main-d'œuvre nécessaire à l'exécution des manipulations, de réduire les déchets générés durant les manipulations, d'augmenter le rendement de l'extraction tout en réduisant les matériaux et l'espace nécessaire durant le processus. C'est une technique qui est surtout utilisée pour analyser la présence et la concentration des pesticides dans la nourriture.

Le principe de base consiste à centrifuger un échantillon contenant la matrice (fruits, légumes, céréales, tabac, etc.) et l'analyte (pesticides) avec des réactifs variés selon le besoin.

#### 2.3.1.2. Types de réactifs utilisés:

- Acétonitrile
- NaCl
- Citrate de disodium

- Citrate de trisodium
- NaOH.
- Adsorbant utilisé en SPE qui est utile pour éliminer le plus d'interférences entre la matrice et l'analyte. Peut être utilisé seul ou avec du graphite de carbone
- GCB-sorbent (noir de carbone graphité)
- Adsorbant utilisé pour l'élimination des substances colorantes.
- MgSO<sub>4</sub> anhydre (grains et poudre fine)
- Acide formique à 5 % dans l'acétonitrile
- Etalons de pesticides
- Étalon interne et étalon de contrôle de qualité

#### 2.3.1.3. Protocole proposé pour la méthode QuEChERS [29] :

10g (soit mL) de l'échantillon ont été ajoutés à 10 ml de 1% d'acide acétique dans l'acétonurie, suivi par tourbillonnement pendant 1 min.

La Partition est produite en utilisant 4 g de MgSO<sub>4</sub> et 1,7 g d'acétate de sodium anhydre, tourbillonnement pendant 1 min et centrifugation à 3400 tr/min pendant 8 minutes à 20 °C. Une aliquote de 8 mL du surnageant a été transféré vers un tube en polypropylène puis refroidi dans de la glace sèche pendant 5 min.

Puis le l'étape de nettoyage a été effectué en éliminant 4 ml du surnageant et en ajoutant 600 mg de MgSO<sub>4</sub>, 500 mg de C18 et 100 mg PSA, suivie par tourbillonnement pendant 1 min et centrifugation à 3400 tr/min pendant 8 min.

Les extraits ont été filtrés avec des filtres en nylon (0,22 µm), dilué 5 fois dans de l'eau ultra pure et soumis à une analyse par LC-MS / MS. Le volume d'injection a été réglée à 10 µL

#### 2.4. Conditions opératoires pour l'analyse des pesticides dans la LC-MS/MS :

Pour obtenir une séparation optimale de l'ensemble des pesticides, il est indispensable d'optimiser les conditions chromatographiques nécessaires à l'analyse

- Gradient d'élution de la phase mobile
- Température du four et de la colonne
- Volume d'injection
- Débit de la phase mobile

On Prend l'exemple d'analyse des pesticides dans les travaux de [29] :

- Un système Acquity UPLCTM (Milford, USA) équipé XEVO-TQ tandem spectromètre de masse quadripolaire de Waters (Manchester, Royaume-Uni) ayant une interface d'ionisation par électropulvérisation (ESI) a été utilisé pour la détermination des pesticides étudiés.

- Les séparations ont été réalisées en utilisant un ACQUITY UPLC BEH C18 la colonne (100 mm, 2,1 mm, taille de particule 1,7 µl) de Waters.
- Le volume d'injection était de 10 µL.
- Les analytes ont été séparés par une phase mobile consistant en éluant A : eau : méthanol (98 : 2, v / v) et éluant B : méthanol, à la fois avec 0,1% d'acide formique et 5 mmol L<sup>-1</sup> le formiate d'ammonium. Un programme de gradient linéaire a été utilisée, avec éluant B, comme suit : 5% à 0 min, 100% à 8,50 min, 5% à 8,51 min jusqu'à 10.00 min.
- Le débit était de 0,225 mL.min<sup>-1</sup>. Le détecteur de spectrométrie de masse a été opéré à l'aide de la source à électro pulvérisation (ESI) en mode positif. ESI paramètres étaient les suivants :
  - Tension capillaire 2,5 kV, température de la source 150 °C
  - Température de désolvatation est 500 °C, et le débit d'azote est de 600 et 80 L.h<sup>-1</sup> pour les cônes et gaz de désolvatation, respectivement.
  - La dissociation induite par collision est effectuée en utilisant l'argon comme gaz de collision à une pression de 4.10<sup>-3</sup> mbar avec un débit de 0,15 ml min<sup>-1</sup>.
  - L'optimisation de l'énergie de collision pour chaque pesticide individuel se fait par perfusion directe dans la station mobile en utilisant un Harvard pompe à seringue (Kent, Royaume Uni). L'acquisition de données a été réalisée en utilisant logiciel Mass Lynx 4.1 (Micromass, Manchester, Royaume-Uni).

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 2-8 [29].

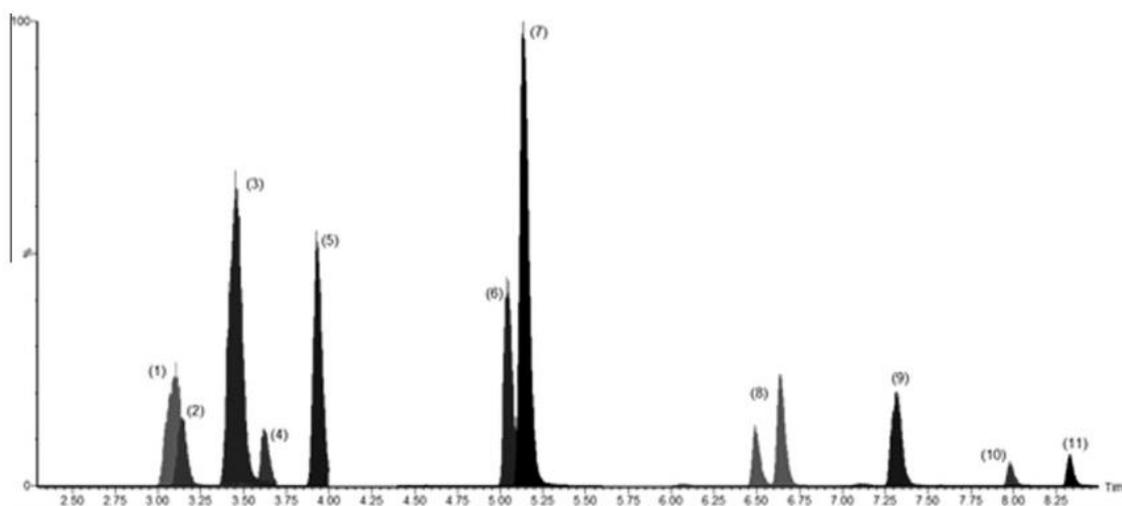


Figure 2- 8 Chromatogramme d'un mélange des pesticides [29]

(1) carbendazim, (2) thiamethoxam, (3) thiabendazole, (4) imidacloprid, (5) 3-OH-carbofuran, (6) thiophanate-methyl, (7) carbofuran, (8) cyproconazole, (9) difenoconazole, (10) spirodiclofen, (11) carbosulfan

## Conclusion Générale :

Les milieux aquatiques naturels subissent une pression anthropique croissante et reçoivent des quantités remarquables des pesticides issus de l'activité humaine, industrielle et agricole. Des suivis environnementaux permanents se sont alors avérés nécessaires afin de se progresser dans la compréhension des origines et des conséquences de la présence de ces polluants.

Du fait de leurs faibles teneurs dans l'eau, leur analyse nécessite des méthodes de d'extraction simple, rapide et qui ont un rendement élevé et des techniques analytiques à la fois spécifiques et sensibles.

La méthode *QuEChERS* est une nouvelle méthode rapide et environnementale de prétraitement et d'extraction des pesticides dans l'échantillon aqueux et permet de réduire considérablement le temps de préparation par rapport à des méthodes classiques et aussi d'économiser l'utilisation et le rejet des solvants organiques avec une petite quantité d'échantillon et un rendement d'extraction plus élevé.

L'optimisation des paramètres de détection en spectrométrie de masse et les conditions de séparation en chromatographie liquide sont des étapes nécessaires pour la réalisation d'une analyse des pesticides.

## Références bibliographiques :

- [1] M. Anastassiades , S.J. Lehotay, D. Tajnbaher, & F.J. Schenck, (2003) J. AOAC. Int. 86, 412-431.
- [2] European Union (EU), 1998. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption.
- [3] A. Couteux, V. Lejeune, Index Phytosanitaire Acta. Ed. ACTA. 2006.
- [4] F. Colin Approche spatiale de la pollution chronique des eaux de surface par les produits phytosanitaires : cas de l'atrazine dans le bassin versant du Sousson (Gers, France). Thèse : Sciences de l'Eau, ENGREF, Montpellier. (2000)
- [5] R.A. Leonard. Pesticide movement into surface waters. Pesticides in the soil environment: Processes, impacts and modeling. In CHENG H.H.(ed). SSSA Bookseries: 9. *Soil Science Society of America: Madison, USA*. (1990) 303-349.
- [6] J. Wohlfahrt, Développement d'un indicateur d'exposition des eaux de surface aux pertes de pesticides à l'échelle du bassin versant. Thèse : Institut National Polytechnique de Lorraine. 2008.
- [7] J.E. Delphin, J.Y. Chapot: Leaching of atrazine, metolachlor and diuron in the field in relation to their injection depth into a silt loam soil. *Chemosphere* 64: 2006, p 1862-1869.
- [8] N. Jarvis, I.G. Dubus: State-of-the-art review on preferential flow. Report DL6 of the FP6 EU-funded FOOTPRINT project [[www.eu-footprint.org](http://www.eu-footprint.org)] 2006 p 60.
- [9] ([www.observatoire-pesticides.gouv.fr](http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr)) consulté le 06/09/2016.
- [10] M. Tissut, P. Delval, J. Mamarot, P. Ravanel, : Plantes, herbicides et désherbage. Ed Acta, 2006.p 635.
- [11] J.N. Aubertot, J.M. Barbier, A. Carpentier, J.J. Gril Guichard, P. Lucas, S. Savary, I. Savini, M. Voltz, : Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux. Rapport d'Expertise scientifique collective, INRA et Cemagref (2005) (France).
- [12] A. Hercegová, M. Dömötöróvá, E. Matisová : Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination. *J Chromatogr A*. (2007) p 54-73.
- [14] R. Desjardins : Traitement des eaux, 2eme Edition, Edition Lavoisier, Paris. 1990.
- [15] F. Edline, : L'épuration physico-chimique des eaux, théorie et technologie. Édition CEBEDOC EDITEUR 2ème édition, LIEGE, 1992. P 251-271.
- [16] N. NAIB : Etude du procédé d'adsorption du phénol sur du charbon actif à base de grignon d'olive, modélisation par les plans d'expérience, Mémoire de Magister, Université M'Hamed Bougara, Boumerdes. (2006)
- [17] Y. Onal, Akmil-Basar, Sarici-Ozdemir : investigation kinetics mechanisms of adsorption

malachite green onto activated carbon, journal of hazardous materials, 146 (2007) p194-203.

[18] M. Djerbi : Précis de phoeniculture. Ed.FAO, Rome, 1994. p 52-58.

[19] M. Mazoyer : le monde agricole au XXIème siècle. Ed. Mathilde Majorel, 2002 p 22.

[20] M. Feldman: Evolution of plants. Ed. Longman, London, 1976. p120-128.

[21] E. Espiard : Introduction à la transformation industrielle des fruits. Ed. Tech et Doc-Lavoisier, 2002. P360.

[22] La mise en œuvre de la fermentation de jus de datte étude cinétique et biochimique, mémoire d'ingénieur en sciences alimentaire, mascara, 21-22-23.

[23] P. Gilles : Cultiver le palmier dattier, Ed. CIRAS, (2000) 110.

[24] G. Toutain : Eléments d'agronomie saharienne de la recherche au développement. Ed. JOUVE, Paris, (1979). P 276.

[25] Eléments d'agronomie saharienne et la recherche au développement, marrakech, maroc, 277.

[26] Interactions involving plants, homoptera, and ants. annual review of ecology and systematics, 111-135.

[27] Quelques données sur la bio-écologie d'ectomyelois ceratoniae dans les régions de touggourt et de ouargla, en vue d'une éventuelle lutte contre ce prédateur, mémoire d'ingénieur en agronomie, i.a.s., Ouargla, 62.

[28] M. Buelguedj : Caractéristiques des cultivars de dattes dans les palmeraies du Sud - Est Algérien, N° 11, Ed. INRAA. El-Harrach, Alger, (2001). p 289.

[29] J. A. Ferreira, J. M. Santos Ferreira, V. Talamini, Janice de Fátima Facco, T. M. Rizzetti, O. D. Prestes, M. B. Adaime, R. Zanella, C. B. G. Bottoli : Determination of pesticides in coconut (Cocos nucifera Linn.) water and pulp using modified QuEChERS and LC-MS/MS, Food Chemistry 213 (2016) 616-624.

[30] Code international de conduite pour la distribution et l'utilisation des pesticides, <http://www.fao.org/DOCREP/006/Y4544F/y4544f02.htm>, FAO 2003.

[31] Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Evaluation des risques sanitaires liés aux dépassements de la limite de qualité des pesticides dans les eaux destinées à la consommation humaine, Juin 2004 à avril 2007, Tom I.

[32] Journal officiel de république algérienne démocratique et populaire n°18, 50ème année, Annexe : Paramètres de qualité de l'eau de consommation humaine, 23 mars 2011.