



## Méthodes

### Dosage des résidus de néonicotinoïdes dans le nectar par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)

Anne-Claire Martel (anne-claire.martel@anses.fr), Patrick Mangoni, Cristina Gastaldi-Thiery  
Anses, Laboratoire de Sophia-Antipolis (France)

**Le nectar est un liquide sucré produit par les nectaires des plantes. Il constitue l'aliment énergétique essentiel de l'abeille. Ces plantes mellifères visitées par les pollinisateurs peuvent contenir des résidus de pesticides suite à des traitements phytosanitaires ou à la contamination de l'environnement (sol, eau, air). Les abeilles peuvent alors entrer en contact avec ces résidus par l'intermédiaire du nectar contaminé qu'elles ramènent dans la colonie. Ainsi, le laboratoire a mis au point une méthode de dosage des résidus de néonicotinoïdes dans le nectar afin de rechercher une éventuelle implication de ces insecticides dans les cas d'affaiblissements de colonies d'abeilles.**

#### Principe de la méthode

Les pesticides recherchés (imidaclopride, clothianidine, acétamipride, thiaclopride, thiaméthoxam et dinotéfuran) appartiennent à la famille des néonicotinoïdes (**Figure 1**) et sont des substances chimiques utilisées en agriculture (**Tableau 1**) soit pour l'enrobage des semences soit par pulvérisation foliaire sur les cultures. Ce sont des molécules systémiques qui peuvent se retrouver dans les plantes et les divers compartiments de l'environnement. À noter que ces substances sont suffisamment rémanentes dans les sols (Goulson, 2013) pour que les plantes cultivées l'année suivante et même non traitées, ainsi que les adventices, les assimilent. Ainsi, le nectar sécrété par les plantes peut être un bon indicateur de leur contamination par ces résidus (Dively et Kamel, 2012; Stoner et Eitzer, 2012) et

en même temps, constitue un des principaux vecteurs pour la contamination des butineuses et de leur colonie. Quand la butineuse est de retour à la ruche, elle régurgite dans les alvéoles, le nectar de son jabot. Une abeille pourrait transporter dans son jabot jusqu'à 75 mg de nectar.

Sur le plan analytique, le nectar constitue une matrice composée principalement d'eau et de sucres (fructose, glucose et, en bien moindre quantité, des sucres complexes tel que le saccharose). La teneur en eau du nectar varie considérablement, de 20 à 95 % selon les espèces végétales nectarifères et les facteurs environnementaux, notamment météorologiques (humidité de l'air, température...). La composition en sucres varie aussi selon les espèces végétales (Nicolson et Thornburg, 2007). Elle est relativement fixe pour une espèce donnée ou même pour une famille donnée. On distingue, selon la nature des sucres et leurs proportions, les plantes à nectar dont le saccharose est dominant, celles où le saccharose est en quantité égale à celle du glucose et du fructose (trèfle blanc) et celles où le glucose et le fructose sont dominants (colza) (Kevan et Shuel, 1991). Le rapport entre le glucose et le fructose est aussi généralement fixe pour une espèce. Par exemple, pour le colza, la teneur en glucose est supérieure au fructose et peut provoquer la cristallisation rapide.

La méthode de dosage de ces six insecticides toxiques pour l'abeille (**Tableau 2**) repose sur une extraction par dissolution. L'échantillon de nectar obtenu est dilué dans l'eau ultra pure afin d'être injecté et analysé en chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-ESI-MS/MS). Cette méthode d'analyse multirésidus permet de quantifier et d'identifier les résidus de néonicotinoïdes dans la matrice « nectar ». La limite de quantification (LQ) est de 0,3 pg/µl pour tous les pesticides sauf pour le dinotéfuran dont la LQ est de 0,6 pg/µl.

#### Appareillage et réactifs

L'appareillage spécifique consiste en (1) une propipette pour extraire les échantillons de nectar des micro-capillaires; (2) une centrifugeuse (Centrifuge 5810R, Eppendorf); (3) un chromatographe en phase liquide (HPLC) avec un injecteur automatique et un compartiment colonne thermostatés (UltiMate 3000, Thermo Scientific) couplé à un spectromètre de masse triple quadripôle (TSQ Vantage, Thermo Scientific) équipé d'une sonde HESI-II (Heated Electrospray Ionization Source).

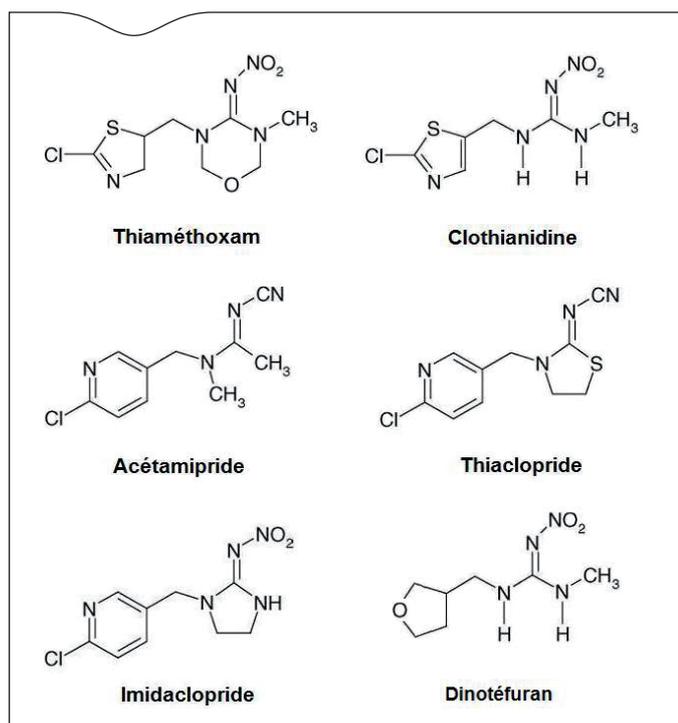


Figure 1: Formules des pesticides étudiés.



## Méthodes

Tableau 1: Les usages des néonicotinoïdes en agriculture (Agritox, 2013; Index phytosanitaire, 2013; Mitsui Chemicals America, 2013)

| Pesticide      | Solubilité dans l'eau (g/l) | Type d'application               | Cultures traitées  | Noms commerciaux                             |
|----------------|-----------------------------|----------------------------------|--|--|
| Imidaclopride* | 0,613                       | Traitement des semences, plants  | Betterave, avoine, blé, orge, seigle   | Ferial<br>Gaucho 350<br>Imprimo<br>Nuprid 70 |
|                |                             | Traitement des parties aériennes | Abricotier, pêcher, prunier, rosier, conifères de forêt  | Confidor<br>Merit Forest<br>Nuprid 200       |
| Clothianidine* | 0,304                       | Traitement des parties aériennes | Mais, sorgho, pommier  | Cheyenne<br>Dantop 50 WG                     |
| Acétamipride   | 2,95                        | Traitement des parties aériennes | Arbres fruitiers ( <i>abricotier, agrumes, cerisier, figuier, pêcher, poirier, pommier, prunier</i> ), grandes cultures ( <i>pomme de terre, crucifères oléagineuses, avoine, blé</i> ), cultures légumières ( <i>asperge, aubergine, choux, concombre, courgette, laitue, persil, poivron, tomate, betterave</i> ), rosier, cultures florales diverses, cultures porte-graine | Suprême<br>Suprême 20SG<br>Polysect Ultra    |
| Thiaclopride   | 0,186                       | Traitement des parties aériennes | Arbres fruitiers ( <i>abricotier, groseillier, amandier, cassissier, cerisier, châtaignier, figuier, framboisier et autres rubus, noisetier, noyer, olivier, pêcher, poirier, pommier, prunier</i> ), grandes cultures ( <i>colza, moutarde, pomme de terre</i> ), cultures porte-graine   | Biscaya<br>Calypso<br>Ecail<br>Proteus       |
|                |                             | Traitement des sols              | Arbres et arbustes d'ornement, cultures florales diverses  | Exemptor                                     |
| Thiaméthoxam*  | 4,1                         | Traitement des semences, plants  | Betterave, maïs, pois  | Cruiser 350<br>Cruiser FS<br>Cruiser SB      |
|                |                             | Traitement des parties aériennes | Pomme de terre, pommier, aubergine, concombre, laitue, piment, poivron, tomate, arbres et arbustes d'ornement, chrysanthème, cultures florales diverses, rosier, toutes espèces florales (sous serres)   | Actara<br>Flagship Pro                       |
|                |                             | Traitement des sols              | Arbres et arbustes d'ornement, cultures florales diverses (sous serres), rosier (sous serres)  | Flagship Pro                                 |
| Dinotéfuran**  | 39,83                       | Traitement des parties aériennes | Riz, choux, laitue, poivron, tomate, concombre, melon, céleri, agrumes, pommier, pêcher, pomme de terre, coton   | Safari 20SG<br>Safari 2G                     |

\* L'Union européenne a annoncé en avril 2013 qu'elle suspendra pour deux ans, à compter du 1<sup>er</sup> décembre, l'utilisation de l'imidaclopride, de la clothianidine et du thiaméthoxam sur quatre grandes cultures (maïs, colza, tournesol et coton).

\*\* Le dinotéfuran est interdit en Europe sur toutes cultures.

Tableau 2: Toxicité des pesticides étudiés vis-à-vis des abeilles (Agritox, 2013, EPA, 2004)

| Pesticide     | DL <sub>50</sub> (contact) | DL <sub>50</sub> (orale) |
|---------------|----------------------------|--------------------------|
| Imidaclopride | 81 ng/abeille              | 3,7 ng/abeille           |
| Clothianidine | 44,26 ng/abeille           | 3,79 ng/abeille          |
| Acétamipride  | 8,09 µg/abeille            | 14,53 µg/abeille         |
| Thiaclopride  | 38,82 µg/abeille           | 17,32 µg/abeille         |
| Thiaméthoxam  | 24 ng/abeille              | 5 ng/abeille             |
| Dinotéfuran   | 47 ng/abeille              | 23 ng/abeille            |

Pour l'analyse en LC-MS/MS, le méthanol de qualité LC-MS et l'acide formique (98 %) sont utilisés. Les étalons sont préparés à partir des matières actives certifiées commandées chez CIL Cluzeau Info Labo: imidaclopride (98 % de pureté), clothianidine (99,5 %), acétamipride (99 %), thiaclopride (99,5 %), thiaméthoxam (99 %) et dinotéfuran (99 %). La solution certifiée de diméthoate-D6 (99,8 % de pureté, 100 mg/l dans l'acétone) provient également de CIL Cluzeau Info Labo.

### Mode opératoire

#### 1. Extraction

L'échantillon de nectar est extrait de la fleur par capillarité à l'aide d'un micro-capillaire (5 µl). Ce prélèvement est extrait du micro-capillaire en laboratoire à l'aide d'une propipette. Dans un

vial à insert, sont ajoutés l'eau ultra pure, 10 µl d'étalon interne (diméthoate-D6) et 10 µl d'échantillon de nectar. L'échantillon de nectar est ensuite homogénéisé à l'aide d'un vortex puis centrifugé à 500 t/min pendant cinq minutes. Le volume de l'extrait final est de 100 µl.

### 2. Dosage

#### 2.1. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

La séparation chromatographique est réalisée sur colonne chromatographique Pursuit PFP (pentafluorophenyl) 100 x 3 mm (3 µm) (Agilent). La phase mobile est composée d'eau ultra pure (A) et de méthanol (B), chaque solution étant acidifiée avec 0,02 % d'acide formique. Les insecticides sont séparés à l'aide d'un gradient d'éluion dont le programme est le suivant : gradient linéaire de 80 % A (à t=0 min) à 0 % (à t=13 min), puis gradient linéaire de 0 % A (à t=13 min) à 80 % (à t=13,5 min) et palier à 80 % A pendant 4,5 min. La colonne et le passeur d'échantillons sont thermostatés à 25°C, le débit est de 0,4 ml/min et le volume d'injection est de 15 µl.

#### 2.2. Spectrométrie de masse

La source d'ionisation utilisée est l'electrospray en mode positif (HESI-II +). La vanne de dérivation (divert valve) est réglée pour laisser passer la phase mobile dans la source entre 2,50 min et 12 min. L'analyseur de masse est un triple quadripôle et le gaz de collision est de l'argon. Le mode d'acquisition mis en



## Méthodes

œuvre est le mode SRM (Selected Reaction Monitoring). Les transitions ainsi que les temps de rétention (à titre indicatif) sont présentés dans le **tableau 3**.

**Tableau 3: Transitions des pesticides étudiés et temps de rétention (à titre indicatif)**

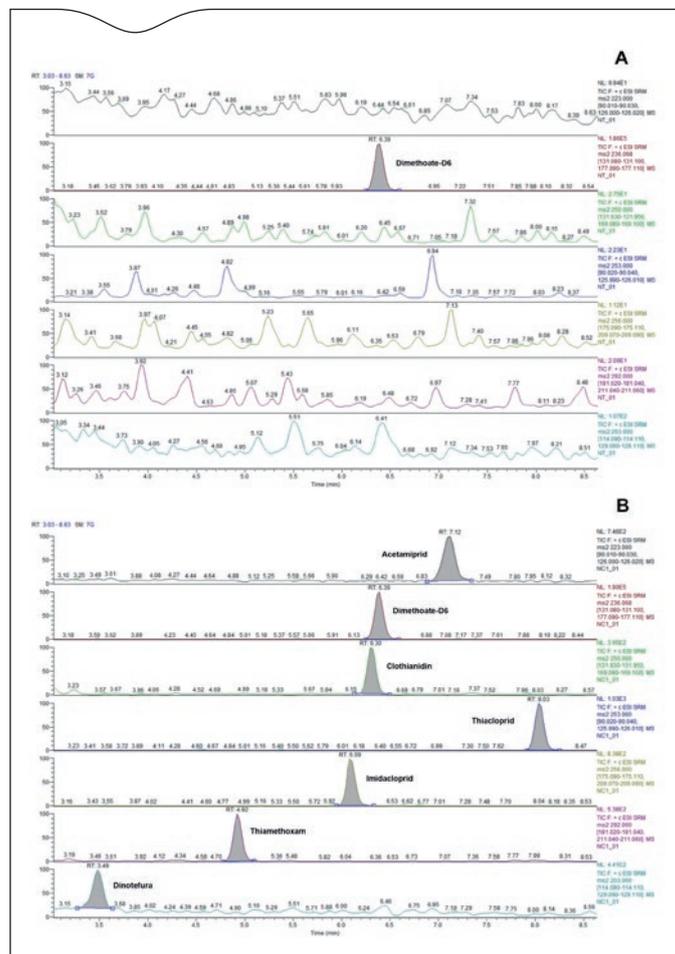
| Pesticide     | Temps de rétention (min) | Ion précurseur (m/z) | Ions produits (m/z) | Energie de collision (V) | S-Lens   |
|---------------|--------------------------|----------------------|---------------------|--------------------------|----------|
| Dinotéfuran   | 3,49                     | 203,0                | 114,1<br>129,1      | 13<br>13                 | 43<br>43 |
| Thiaméthoxam  | 4,92                     | 292,0                | 211,0<br>181,0      | 13<br>24                 | 57<br>57 |
| Imidaclopride | 6,09                     | 256,0                | 209,1<br>175,1      | 18<br>20                 | 65<br>65 |
| Clothianidine | 6,30                     | 250,0                | 169,1<br>131,9      | 15<br>19                 | 54<br>54 |
| Diméthoate-D6 | 6,39                     | 236,0                | 177,1<br>131,0      | 16<br>22                 | 43<br>43 |
| Acétamipride  | 7,12                     | 223,0                | 126,0<br>90,0       | 21<br>34                 | 53<br>53 |
| Thiaclopride  | 8,03                     | 253,0                | 126,0<br>90,0       | 22<br>39                 | 71<br>71 |

### Résultats et conclusion

Pour le dosage, l'étalonnage est effectué à l'aide d'une gamme extraite dans la matrice « nectar » (échantillons témoin et supplémentés). Ne disposant pas toujours de nectar témoin, une solution sucrée représentative d'un nectar est préparée pour cet étalonnage. Cette solution composée à 36 % de sucres (p/v) est préparée en mélangeant 6 g de glucose et 3 g de fructose dans 25 ml d'eau ultra pure. Le domaine de linéarité est défini comme étant le domaine d'étalonnage et a été validé jusqu'à 15 pg/µl pour chaque pesticide.

Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) sont respectivement de 0,1 pg/µl et 0,3 pg/µl pour l'imidaclopride, la clothianidine, le thiaclopride et le thiaméthoxam. La LD et la LQ sont respectivement de 0,2 pg/µl et 0,6 pg/µl pour le dinotéfuran (**Figure 2**).

En l'absence de matériau de référence, la justesse est estimée par le taux de récupération qui est déterminé à l'aide d'un échantillon témoin (blanc matrice) supplémenté avec les



**Figure 2: Chromatogrammes obtenus en LC-MS/MS pour (A) l'échantillon témoin (solution sucrée à 36 %) et pour (B) l'échantillon chargé à la LQ.**

analytes à doser à trois niveaux de concentration (LQ, 5LQ et 10LQ). Pour chaque niveau de concentration, trois échantillons de solutions sucrées ont été extraits et analysés. Pour caractériser la méthode, cinq séries de trois échantillons ont

**Tableau 4: Données de caractérisation de la méthode (Norme AFNOR V03-110).**

| Pesticide     | Solution sucrée représentative d'un nectar                     |                     |                     |                      |                 |   |                     |                     |                      |                 |   |                     |                     |                      |                 |
|---------------|--|---------------------|---------------------|----------------------|-----------------|---|---------------------|---------------------|----------------------|-----------------|---|---------------------|---------------------|----------------------|-----------------|
|               | 1 <sup>er</sup> niveau de supplémentation (n=3, répété 5 fois) |                     |                     |                      |                 | 2 <sup>e</sup> niveau de supplémentation (n=3, répété 5 fois) |                     |                     |                      |                 | 3 <sup>e</sup> niveau de supplémentation (n=3, répété 5 fois) |                     |                     |                      |                 |
|               | T (pg/µl)  | Rendement moyen (%) | CV <sub>r</sub> (%) | CV <sub>Fi</sub> (%) | Incertitude (%) | T (pg/µl)   | Rendement moyen (%) | CV <sub>r</sub> (%) | CV <sub>Fi</sub> (%) | Incertitude (%) | T (pg/µl)   | Rendement moyen (%) | CV <sub>r</sub> (%) | CV <sub>Fi</sub> (%) | Incertitude (%) |
| Imidaclopride | 0,3  | 106,7               | 8,6                 | 12,5                 | 26,6            | 1,5   | 95,8                | 6,6                 | 8,2                  | 17,4            | 3,0   | 98,3                | 4,5                 | 6,6                  | 14,0            |
| Clothianidine | 0,3  | 99,8                | 7,5                 | 11,5                 | 24,6            | 1,5   | 95,2                | 6,7                 | 8,4                  | 17,7            | 3,0   | 97,3                | 5,1                 | 5,9                  | 12,4            |
| Acétamipride  | 0,3  | 106,8               | 7,3                 | 9,0                  | 18,9            | 1,5   | 96,5                | 6,1                 | 7,0                  | 14,7            | 3,0   | 98,7                | 5,2                 | 6,8                  | 14,5            |
| Thiaclopride  | 0,3  | 110,2               | 6,4                 | 9,2                  | 19,5            | 1,5   | 96,6                | 6,0                 | 7,4                  | 15,6            | 3,0   | 99,7                | 5,2                 | 6,9                  | 14,7            |
| Thiaméthoxam  | 0,3  | 98,9                | 9,4                 | 16,3                 | 35,1            | 1,5   | 93,0                | 7,4                 | 10,4                 | 22,2            | 3,0   | 92,6                | 5,5                 | 9,6                  | 20,7            |
| Dinotéfuran   | 0,6  | 105,5               | 7,4                 | 14,0                 | 30,2            | 3,0   | 93,5                | 6,5                 | 9,7                  | 20,7            | 6,0   | 94,7                | 5,1                 | 7,0                  | 15,0            |

T: teneur en pesticide, CV<sub>r</sub>: répétabilité, CV<sub>Fi</sub>: fidélité intermédiaire



## Méthodes

été effectuées pour chaque niveau de concentration. Les taux d'extraction moyens obtenus sont satisfaisants car, à la LQ, ils sont compris entre 98,9 % et 110,2 %, compris entre 93,0 % et 96,6 % et entre 92,6 % et 99,7 % pour les échantillons supplémentés à 5LQ et 10LQ respectivement (norme V03-110). La méthode est répétable car le coefficient de variation (CV) est  $\leq 20\%$  pour chaque niveau de concentration. La méthode est également reproductible ( $CVFI \leq 22\%$ ) pour tous les pesticides étudiés (Tableau 4).

Par conséquent, cette méthode permet de quantifier des résidus à très faibles teneurs et peut ainsi être appliquée sur des échantillons de nectar prélevés directement dans les fleurs (Figure 3) ou dans les jabots d'abeilles pour suivre l'exposition des butineuses aux contaminants de l'environnement.

### Remerciements

Nous remercions le Cetiom et l'Inra d'Avignon (UMT PrADE) qui nous ont fourni des nectars de colza.

### Références bibliographiques

AGRITOX, 2013, *Base de données sur les substances actives phytopharmaceutiques*. [consulté en 2013] <http://www.agritox.anses.fr/php/fiches.php>

Index phytosanitaire, 2013. ACTA, 49<sup>e</sup> édition, 984 p.

Mitsui Chemicals America, Inc.: Dinotefuran Field Performance [consulté en 2013] <http://www.mitsuichemicals.com/dinotefuran-field-performance.htm>

Goulson D. 2013. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*, 50(4): 977-987.

Dively GP, Kamel A. 2012. Insecticide residues in pollen and nectar of a cucurbit crop and their potential exposure to pollinators. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(18): 4449-56.

Stoner KA, Eitzer BD. 2012. Movement of soil-applied imidacloprid and thiaméthoxam into nectar and pollen of squash (*Cucurbita pepo*), *PLoS ONE*, 7(6): e39114.

Nicolson SW, Thornburg RW. Nectar Chemistry. 2007 [consulté en 2013] [http://www.bb.iastate.edu/~thorn/www/Publications/pdfFiles/12\\_Nectar\\_Chemistry\(Proof\).pdf](http://www.bb.iastate.edu/~thorn/www/Publications/pdfFiles/12_Nectar_Chemistry(Proof).pdf)

Kevan PG, Lee H, Shuel RW. 1991. Sugar ratios in nectars of varieties of canola (*Brassica napus*), *Journal of Apicultural Research*, 30(2): 99-102.

EPA, Pesticide Fact Sheet: Name of Chemical: Dinotefuran - Reason for Issuance: Conditional Registration - Year Issued: September 2004, United States Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7501C). [consulté en 2013] [http://www.epa.gov/opp00001/chem\\_search/reg\\_actions/registration/fs\\_PC-044312\\_01-Sep-04.pdf](http://www.epa.gov/opp00001/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-044312_01-Sep-04.pdf)

Normalisation française. *Analyse des produits agricoles et alimentaires: protocole de caractérisation en vue de la validation d'une méthode d'analyse quantitative par construction du profil d'exactitude*, Norme Anfor V03-110 (Mai 2010).

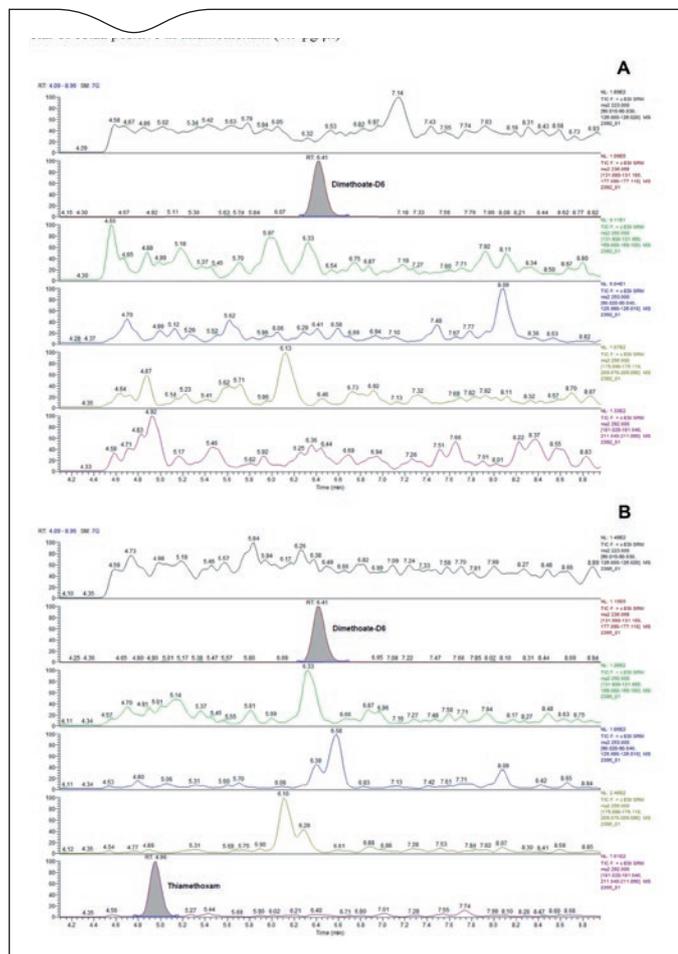


Figure 3: Chromatogrammes obtenus en LC-MS/MS pour (A) un échantillon témoin de nectar de colza et pour (B) un échantillon de nectar de colza positif en thiaméthoxam (0,5 pg/µl).