



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah

Faculté des Sciences et Techniques

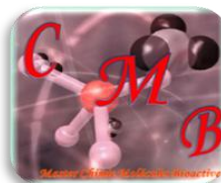
www.fst-usmba.ac.ma



Année Universitaire : 2012-2013

Master Sciences et Techniques : CMBA

Chimie des Molécules Bio Actives



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

**Analyse médico-légale de certains toxiques organiques :
Méthode d'extraction purification et dosage**

Présenté par:

SAADI Elhaj

Encadré par:

- Pr E.M. EL HADRAMI
- Mme Mama IDAMINE

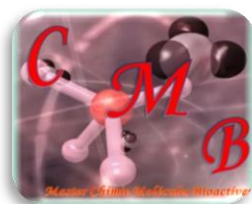
Soutenu Le 18 Juin 2013 devant le jury composé de:

- Mr. A. BEN TAMA
- Mr. B. IHSSANE
- Mr. E. M. EL HADRAMI

Stage effectué à : l'Institut National d'Hygiène de Rabat



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



Nom et prénom: SAADI Elhaj

Année Universitaire : 2012/2013

Titre:

**Analyse médico-légale de certains toxiques organiques :
Méthode d'extraction purification et dosage**

Résumé

Ce travail a été mené à l'Institut National d'Hygiène de Rabat, au département de toxicologie. Il s'intéresse aux analyses toxicologiques des pesticides organochlorés et organophosphorés qui sont beaucoup plus utilisés dans les domaines agricoles et non agricoles dans le but de lutter contre des ravageurs responsables de la réduction des produits agricoles et des vecteurs de certaines maladies.

Une étude bibliographique sur les pesticides objet de cette étude nous a permis de constater que le danger des pesticides est imminent, soit par contamination indirecte soit suite à des tentatives de suicide. Leur utilisation non contrôlée produit une bio-accumulation dans les chaînes trophiques, ce qui entraîne une forte contamination des chaînes alimentaires de l'homme.

Dans ce cadre, des dizaines d'échantillons provenant de décès, ont été prélevés et soumis à une préparation physicochimique. Dans ces échantillons, on a analysé certains pesticides : *les Organophosphorés*, les *Organochlorés* et les *Carbamates*, par chromatographie sur couche mince et chromatographie gazeuse couplée au spectromètre de masse, et un raticide : *Phostoxine* analysé par Absorption Atomique.

Mots clés: Pesticides, chromatographie sur couche mince, chromatographie gazeuse couplée au spectromètre de masse, analyse toxicologique.



Dédicaces

Je dédie ce travail

À ma mère, mon père, pour qui mes estimes sont immenses, je vous remercie pour tout ce que vous avez fait pour moi, que dieu vous procure une longue vie.

À mes frères pour la joie qu'ils apportent à ma vie.

À la famille ZORRAN et la famille AZELMAD pour leur soutien.

À mes enseignants pour leurs patiences.

À mes collègues pour leurs gentillesse et à toutes les personnes qui ont contribué à ma formation.

À tous mes amis dont je ne cite pas les noms pour n'en oublier aucun,

Je vous dédie ce travail et je vous souhaite un avenir à la hauteur de vos ambitions. Que notre amitié dure.

À tous ceux qui, un jour, ont pensé à moi, les plus beaux mots ne sauraient exprimer ma reconnaissance.

À moi.



Sommaire

Remerciement	7
Liste des tableaux et annexes	8
Liste des figures	8
Liste des abréviations	9
Introduction	11
Chapitre I : Synthèse bibliographique sur les pesticides	15
I. Intoxication par les pesticides	16
I.1. Définitions et classifications	16
I.1.1. Premier système de classification	17
I.1.2. Deuxième système de classification	17
I.2. Pesticides et caractéristiques physicochimiques	18
I.3. Les organochlorés (OC).....	19
I.4. Les organophosphorés (OP).....	20
I.5. Les carbamates.....	22
I.6. Toxicologie des pesticides	23
I.6.1. Impact sur l'homme.....	23
I.6.2. Étude de l'activité biologique des organophosphorés	24
I.6.3. Toxicité aiguë et chronique	29
I.7. Consommation des pesticides au Maroc	29
I.8. Les intoxications relevées par les pesticides au Maroc	30
II. Intoxication par Phostoxine	31
II.1. Définition	31
II.2. Les différentes voies de contaminations	32
II.2.1. voie orale.....	32
II.2.2. voie nasale.....	33



II.3. Devenir dans l'organisme	34
II.4. Mécanisme d'action	34
Chapitre II : Les techniques d'analyses de pesticides.....	36
I. Introduction.....	37
II. Techniques utilisées et analyse des échantillons	37
II.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	37
II.1.1. Généralités	37
II.1.2. Principe de fonctionnement.....	37
II.2. Chromatographie Gazeuse couplée au spectre de masse (GC-MS).....	38
II.2.1. Généralités	38
II.2.2. Principe de fonctionnement.....	39
II.3. Analyse de phostoxine par spectrométrie d'absorption atomique	40
II.3.1. Généralité.....	40
II.3.2. Principe.....	40
II.4. Préparation des échantillons	42
II.4.1. Prélèvements	42
II.5. Analyse des matrices biologiques par CCM.....	44
II.5.1. Méthode d'analyse	44
II.5.2. Préparation des cuves et plaques	45
II.6. Analyses par GC-SM	46
II.7. Méthode d'analyse de phostoxine.....	46
II.7.1. Échantillons.....	47
II.7.2. Dosage des traces d'aluminium	47
Résultats & Discussions.....	50
I. Résultats.....	50
I.1. Résultats d'analyse par CCM.....	50
I.2. Résultats d'analyse par GC-MS	51
I.3. Résultats d'analyse de Phostoxine par spectrométrie d'absorption atomique	54



II. Discussion	54
II.1. Analyse par CCM	54
II.2. Analyse par GC-MS.....	55
II.3. Analyse de Phostoxine par SAA.....	56
Conclusion	57
Annexes	58
Bibliographie	64



Remerciement

Le présent rapport a été entrepris aux laboratoires d'analyses de l'Institut National d'Hygiène, Rabat.

Que Monsieur **Adnane BOUHAFI**, Chef de services du personnel administratif de l'INH, trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance de m'avoir accordé cette opportunité de stage à ce centre et pour son soutien continue pour promouvoir les travaux de recherche entre l'Université et le INH.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur **Abdallah EL ABIDI**, chef du département de toxicologie et hydrologie de m'avoir accueilli au sein de son service.

Je voudrais également exprimer toute ma gratitude à Monsieur **Fouad OUAZZANI CHAHDI**, responsable du master « Chimie des Molécules Bio Actives », pour l'intérêt et le suivi qu'il m'a porté et de ses précieux conseils promulgués durant cette formation.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers Monsieur le professeur **EL Mestafa EL HADRAMI** pour l'honneur qu'il me fait d'accepter d'être mon parrain de ce stage. Je le remercie à plus d'un titre.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers **M^{me} Mama IDAMINE**, ingénieur à l'INH pour ses conseils et nos discussions constructives, elle me fait un grand plaisir en acceptants de superviser mon travail.

Je suis très reconnaissant à Monsieur **Radouan SAADI**, pour son soutien technique et son participation à la production de ce rapport.

Je tiens à remercier également tout les membres de département de toxicologie et hydrologie pour leur disponibilité, leurs orientations et leurs précieuses directives, tout au long de cette période de stage.



Que les membres du jury trouvent ici l'expression de mon remerciement pour avoir bien voulu examiner et juger ce travail.

Liste des tableaux et annexes

Tableau 1 : Solvants constituant l'éluant de chaque cuve.....	45
Tableau 2 : Différents révélateurs des toxiques recherchés.....	45
Tableau 3 : Résultats d'analyse par CCM	50
Tableau 4 : Résultats d'analyse par GC-MS.....	52
Tableau 5 : Résultats de dosage d'aluminium par SAA.....	54
Annexe 1 : Caractéristiques physico-chimiques des quelques pesticides.....	58
Annexe 2 : Spécification de la Technique de GC-MS.....	59
Annexe 3 : Analyse de phostoxine par spectrométrie d'absorption atomique.....	60
Annexe 4 : Les chromatogrammes des échantillons analysés par GC-MS	61

Liste des figures

Figure 1 : structure générale de deux groupes des pesticides chlorés.....	19
Figure 2 : Structures chimiques des pesticides organochlorés	20
Figure 3 : Structure de quelques pesticides organophosphorés	21
Figure 4 : structures de deux carbamates.....	23
Figure 5 : le rôle de l'AChE et ACh dans la transmission cholinergique.	25
Figure 6 : Mécanisme d'hydrolyse de l'acétylcholine par l'acétylcholinestérase	26
Figure 7 : L'effet d'un substituant attracteur d'électrons sur la réactivité des Paraoxon	27
Figure 8: la phosphorylation, et l'inhibition irréversible de l'AChE.....	28
Figure 9 : Comprimés de phostoxine.....	32
Figure 10: les trois enzymes inhibées par le phosphore d'aluminium.....	35
Figure 11 : plaque de chromatographie	38



Figure 12: Appareil GC-MS	39
Figure 13 : spectrométrie d'absorption atomique à four.....	41
Figure 14 : Extraction en milieux acide et basique.....	44
Figure 15 : Préparation des échantillons.....	46
Figure 16 : La minéralisation du sang	48
Figure 17 : Plaque CCM des OP.....	51
Figure 18: structure de Dimeton	52
Figure 19 : chromatogramme de l'échantillon 469.....	53
Figure 20 : spectre de masse de Dimeton	53
Figure 21 : schéma d'appareil GC-MS.....	60
Figure 22 : dispositif de la spectrométrie d'absorption atomique.....	60
Figure 23 : chromatogramme échantillon 1	62
Figure 24 : chromatogramme échantillon 471.....	62
Figure 25 : chromatogramme échantillon 472.....	63
Figure 26 : chromatogramme échantillon 439.....	63

Liste des abréviations

AChE	Acétylcholinestérase
ACh	Acétylcholine
AMIPHY	Association Marocaine des négociants importateurs et formulateurs de produits phytosanitaires
CAPM	Centre Anti – Poison du Maroc
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
Ch	Choline
DDD	Dichlorodiphényldichloroéthane
DDE	Dichlorodiphényldichloroéthylène



DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
EPA	Agence Américaine de Protection de l'Environnement
Eq	Équation
GC-MS	Chromatographie Gazeuse couplée au Spectrométrie de Masse
HCH	Hexachlorocyclohexane
Koc	Coefficient de sorption au carbone organique
Kow	Coefficient de partage entre une phase aqueuse et une phase organique
Kd	Coefficient de partage entre le sédiment et l'eau
OC	Organochlorés
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OP	Organophosphorés
REEM	Rapport sur l'Etat de l'Environnement du Maroc
Rf	Retention Factor
S.A.U	Superficie Agricole Utile
SAA	Spectrométrie d'absorption atomique
UV	Ultra Violet
uma	L'unité de masse des atomes unifiée



Introduction

Le développement de la culture industrielle qui est apparu à la suite de la mécanisation agricole confronte le cultivateur à des problèmes nouveaux. Une augmentation considérable des rendements, constitue un terrain favorable au développement des parasites. C'est pourquoi l'application des pesticides est motivée par l'existence de risques de développement de bio-agresseurs tels que les insectes ravageurs, les maladies fongiques, les adventices et autres.

Cependant les pesticides sont une source importante de certains types de pollution. Contrairement à d'autres polluants, ils sont délibérément relâchés dans l'environnement avec comme premier objectif de tuer l'organisme visé. Ils ne sont pas sans effets pour tous les autres organismes non ciblés incluant l'humain. Par la contamination de l'eau, de l'air, des sols et des aliments, ils ont des conséquences sur la santé humaine et environnementale.

Les analyses toxicologiques jouent un rôle essentiel dans la recherche médico-légale, et en particulier la toxicologie médico-légale, elles représentent un support important pour la toxicologie expérimentale et l'évaluation des risques chimiques.

Dans le domaine médico-légal, les analyses toxicologiques permettent d'affirmer le travail analytique du médecin légiste et aussi de détecter une cause toxique de la mort, qui n'aurait pas soupçonnée au cours d'une expertise judiciaire.

Les pesticides font donc partie des substances susceptibles d'occasionner des risques majeurs pour la santé humaine. Divers études scientifiques ont montré que les résidus des pesticides peuvent être responsables d'effets néfastes sur la vie humaine notamment des troubles de la reproduction (oligospermie, puberté précoce), du développement du système nerveux, un dérèglement du système immunitaire, l'apparition de cancer de certains organes (thyroïde,



sein, prostate, estomac), ainsi que des perturbations endocriniennes, (Margariti MG, Tsakalof AK, Tsatsakis AM ; 2007).

Le Centre Anti-Poisons du Maroc (CAPM) a réalisé un certain nombre d'études sur les données recueillies ainsi que des travaux de recherche sur le terrain (publication de thèses, d'articles scientifiques, communications scientifiques...). Ces études ont montré que les intoxications sont loin d'être négligeables au Maroc. Le nombre de cas hospitalisés dans les hôpitaux publics déclarés au CAPM est de 4500 cas par an. Ce chiffre peut être estimé facilement à 10 000 cas par an si l'on tient compte des cas qui ne parviennent pas nécessairement aux hôpitaux publics et ceux qui ne sont pas déclarés au CAPM.

L'exposition de la population Marocaine aux toxiques est très importante et concerne aussi bien les toxiques naturels (scorpion, serpent), traditionnels (plantes, minéraux, produits de la pharmacopée traditionnelle etc...) que modernes (Médicaments, gaz toxiques, pesticides, produits ménagers etc....). La répartition des intoxications selon le produit en cause permet de positionner le scorpion comme première cause d'intoxication (28 %) suivi par les médicaments (18 %), les pesticides (11 %), les aliments (11 %), le monoxyde de carbone (5,5 %), les plantes et les produits de la pharmacopée traditionnelle (2,5 %), puis par les autres toxiques (produits ménagers, toxicomanogènes, solvants etc..). Les toxiques les plus mortels au Maroc sont les plantes et les produits de la pharmacopée traditionnelle dont la létalité est de (17 %) suivie des pesticides (3,5 %), des piqûres de scorpion (1,3 %), des médicaments (1 %), et du monoxyde de carbone (0,8%).

La population marocaine n'est pas avertie des risques des toxiques. Elle ne connaît pas les précautions à prendre pour prévenir l'intoxication ni la conduite à tenir face à une intoxication. Au niveau des structures sanitaires, Les insuffisances soulevées sont l'absence de protocoles thérapeutiques standardisés devant les différentes intoxications, l'absence d'un plateau technique régional permettant le dépistage des toxiques et l'insuffisance en antidotes et en médicaments spécifiques aux intoxications.

L'objet de ce travail est d'analyser et caractériser certains pesticides : les organophosphorés, les organochlorés et les carbamates dans le sang et le liquide gastrique en utilisant trois techniques différentes CCM, GC-MS et SAA, dont le but est de confirmer les hypothèses



cliniques concernant les causes de la mort d'un individu due à une contamination par les pesticides.

Ce manuscrit est scindé en deux parties, la première est consacrée à une étude bibliographique sur les pesticides : leurs types, classification, les risques associés, et le mode d'action sur les organes humains. La seconde partie sera dédiée au volet expérimental à savoir les techniques d'analyses utilisées, la préparation des échantillons et l'interprétation des résultats.

Avant de commencer le premier chapitre, je vais faire une brève sur l'institut national d'hygiène.

L'Institut National d'Hygiène (INH), instance étatique sous la tutelle du Ministère de la Santé, œuvre depuis 1930 à garantir une prise en charge efficace des problèmes d'Hygiène et d'épidémiologie au Maroc.

Les Laboratoires de Référence Nationale ou de Référence OMS de l'INH servent de support technique et de soutien à la politique du gouvernement en matière de Santé publique afin d'assurer la veille et la sécurité sanitaire à l'échelle nationale. Ils assurent l'expertise technique en matière d'hygiène alimentaire, de toxicologie de l'environnement et dans le domaine médico-légal et assurent la coordination de la gestion et de l'utilisation des laboratoires de Santé Publique en vue d'améliorer leur performance.

Dans le domaine de la recherche scientifique, les laboratoires de l'INH développent plusieurs axes de recherche dans des domaines sanitaires et environnementaux et qui ont donné lieu à divers travaux publiés dans des revues nationales et internationales.

Ces travaux de recherche scientifique sont menés dans le domaine des maladies infectieuses, de la génétique médicale et dans le domaine environnemental pour évaluer les risques de contamination des écosystèmes et leur impact sur la santé de la population.

Les missions

Les missions de l'INH gravitent autour des axes suivants :

- Développer l'expertise, l'appui scientifique et technique et entreprendre des recherches dans le domaine de la biologie sanitaire.



- Proposer des normes en matière de biologie sanitaire et assurer toute mission de contrôle dont il pourrait être chargé par l'administration.
- Développer les systèmes de vigilance relatifs à la santé humaine.
- Participer à la formation du personnel médical, paramédical et scientifique dans les domaines relevant de ses compétences et assurer la diffusion de l'information en rapport avec ses compétences.
- Promouvoir et développer la coopération nationale et internationale en matière de biologie et de vigilance.



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah

Faculté des Sciences et Techniques

www.fst-usmba.ac.ma



Chapitre I

Synthèse bibliographique sur les pesticides



I. Intoxication par les pesticides

I.1. Définitions et classifications

Les pesticides ou produits phytosanitaires, sont définis comme des substances ayant des propriétés chimiques qui contribuent à la protection des plantes cultivées et des produits récoltés contre des attaques de champignons, parasites, d'insectes, d'acariens, de rongeurs champêtres ou encore à détruire les adventices ou « mauvaises herbes ». Ils révèlent de la directive 91/414/CE (UE, 1991). Ce sont des formulations contenant une ou plusieurs substances chimiques minérales ou organiques, synthétiques ou naturelles. Les formulations sont en général composées d'une ou de plusieurs substances actives et d'un ou de plusieurs adjuvants. La substance active exerce une action spécifique sur les organismes nuisibles et 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 (Couteux et Lejeune, 2006).

Avant la mise en œuvre de la Directive 91/414/CE, 800 substances actives d'origine végétale, minérale ou de synthèse pouvaient être utilisées en tant que pesticides en Europe (UE, 1991). La révision des substances actives se traduit par un retrait progressif de nombreux produits et la plupart de celles utilisées aujourd'hui sont de nature organique dont un petit nombre est extrait ou dérivé des plantes.

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 compose (2ème système de classification).



I.1.1. Premier système de classification

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

Les herbicides représentent les pesticides les plus utilisés dans le monde, toutes cultures confondues. Ils sont destinés à éliminer les végétaux indésirables 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 et des acides aminés.

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 et le métabolisme des glucides.

Les insecticides 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 et encore les corvicides et corvifuges, respectivement contre les corbeaux et les autres oiseaux ravageurs de culture.

I.1.2. 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.

I.2. Pesticides et caractéristiques physicochimiques

En général, les caractéristiques essentielles pour étudier le devenir et le transport d'un pesticide dans l'environnement (Himel et al, 1990) sont classées selon deux niveaux différents :

• *Au niveau physique :*

- La solubilité (en mg.l^{-1} à une température donnée), dans l'eau généralement, qui est un des paramètres de la lessivabilité des pesticides.
- La pression de vapeur saturante (en unité de pression à une température donnée) renseignant sur la volatilité d'un produit.
- La constante associée de Henry (en $\text{Pa.m}^3.\text{mol}^{-1}$ à une température donnée) évaluant la répartition d'un produit entre la solution du sol et l'atmosphère.
- Le coefficient de distribution dans le sol K_d , normalisé par le pourcentage massique de carbone organique pour les molécules non ionisées (K_{oc} en $\text{cm}^3.\text{g}^{-1}$), utilisés respectivement, pour prévoir la répartition des pesticides entre la solution et la fraction organique insoluble du sol (K_{oc}) ou simplement entre la solution et une masse de sol (K_d), globalement il est le paramètre évaluant la capacité d'adsorption.

• *Au niveau chimique :*

- Les états ioniques (cationique, anionique, basique ou acide).
- Les caractères hydrophiles/hydrophobes.
- La réactivité chimique, photochimique et biologique (constante de transformation de premier ordre par exemple).

Ces propriétés, combinées avec le taux de pesticide appliqué et entrant dans l'environnement peuvent déterminer la distribution des pesticides dans les différents compartiments environnementaux (sol, solution du sol, air, végétaux...) et donc leur potentialité à être transportés le long de chaque voie de transport (atmosphère, eau superficielle...). La persistance environnementale du pesticide est également reliée aux propriétés de celui-ci (Carsel et Smith, 1987).

Les principales caractéristiques physico-chimiques de certains composés, appartenant aux différentes familles chimiques, sont résumées dans les annexes. Ces informations proviennent des diverses bases de données assemblées dans le CRL Datapool des Laboratoires de référence de l'UE pour les résidus de pesticides (www.crl-pesticides-datapool.eu).

I.3. Les organochlorés (OC)

Les pesticides chlorés, aussi connus sous le nom « organochlorés », se répartissent en trois groupes de composés. Le premier est le groupe des dichlorodiphényléthanes, dont le plus connu est le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), et ses produits de dégradation anaérobie dichlorodiphényldichloroéthane (DDD) et aérobie dichlorodiphényldichloroéthylène (DDE). Le deuxième groupe est celui de cyclodiènes, alors que le troisième regroupe les autres composés qui ont des structures différentes. Les structures chimiques générales des deux premiers groupes sont données dans la figure 1.

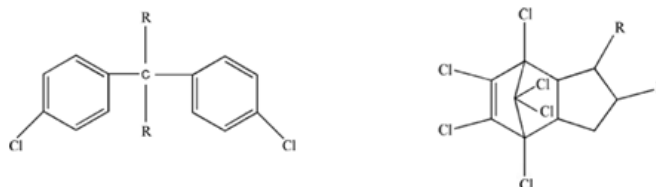


Figure 1 : structure générale de deux groupes des pesticides chlorés

Les propriétés physico-chimiques des pesticides organochlorés étudiés sont résumées dans l'annexe 1. En général, ces pesticides sont stables et persistants dans l'environnement. Ils ont une tendance à s'accumuler dans le sol et dans les organismes. La découverte de leur persistance et de la non-spécificité des effets toxiques, a entraîné l'interdiction de la plupart d'entre eux. Le lindane par exemple, constitué à plus de 99% de l'isomère gamma de l'hexachlorocyclohexane (γ -HCH), est très stable et résistant à la dégradation biologique et photolytique, d'où une grande persistance dans tous les milieux.

Le Log K_{ow} des isomères de HCH qui est environ 3,5 nous indique le grand pouvoir des isomères du HCH à s'accumuler dans les lipides des organismes. Les structures chimiques de quelques composés organochlorés sont illustrées dans la figure 2.

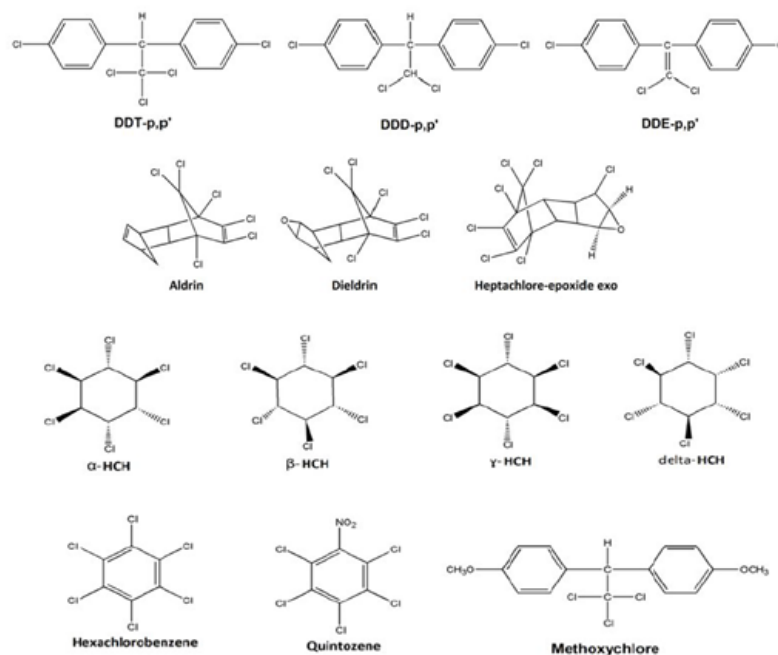
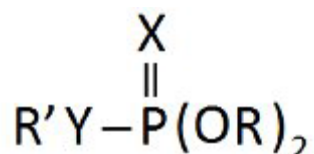


Figure 2 : Structures chimiques des pesticides organochlorés

L'une des propriétés importantes des pesticides organochlorés est leur semi-volatilité. Cette propriété leur confère un degré de mobilité suffisant leur permettant d'atteindre des concentrations relativement grandes dans l'atmosphère et d'être transportés sur de longues distances, et puis se condensés et se déposés dans d'autres régions (Chernyak et al, 1996). Parmi les pesticides organochlorés, seul l'Endosulfane, dont les deux isomères α et β , sont encore autorisés. Il agit sur de nombreux insectes pour une grande variété de cultures. La Dieldrine et l'Heptachlore-époxyde sont des métabolites de l'Aldrine et de l'Heptachlore formés par plusieurs espèces végétales et animales. Ces métabolites sont également persistants dans le milieu naturel.

I.4. Les organophosphorés (OP)

Cette famille a été développée depuis 1944. Les organophosphorés sont des composés organiques du phosphore qui ont des propriétés insecticides, ayant l'avantage d'être moins persistants et moins stables que les organochlorés et donc plus biodégradables, ils leur ont succédé vers les années 70. Les composés organophosphorés peuvent être décrits par la formule générale suivante :



Avec : R = groupe alkyle, X et Y = atomes d'oxygène ou de soufre et R' = groupe de structure variable. On peut ensuite différencier les insecticides organophosphorés en dithioates (X=Y=S), thionates (X=S, Y=O), Thiolates (X=O, Y=S) et phosphates (X=Y=O). Ainsi, ces organophosphorés présentent des structures très diverses, comportant des cycles aromatiques ou des chaînes ramifiées, et des compositions chimiques variables avec présence d'atomes de S, O, N, Cl, Br. Ceci conduit à des propriétés chimiques et toxicologiques très différentes. La figure 3 présente certaines structures des pesticides organophosphorés.

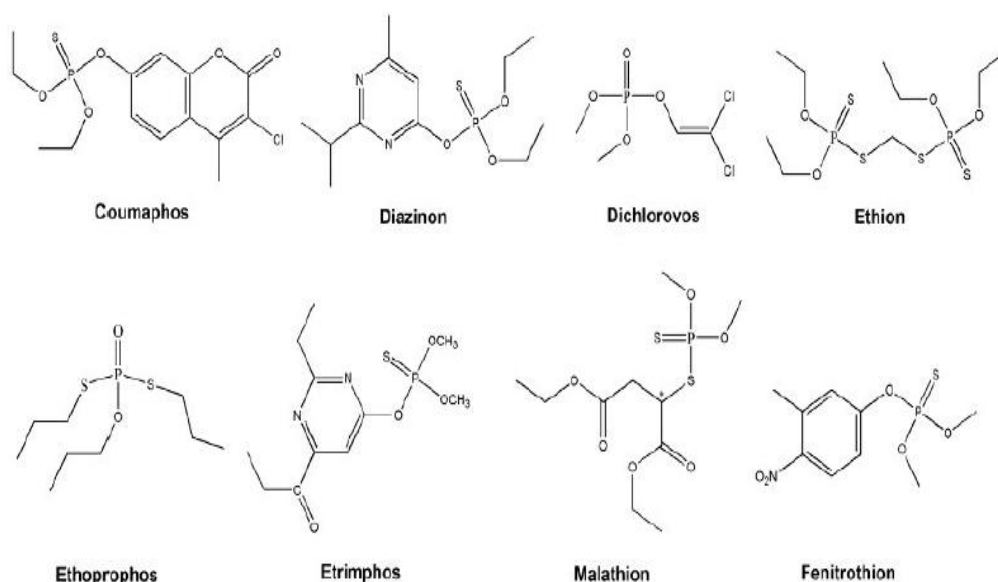


Figure 3 : Structure de quelques pesticides organophosphorés

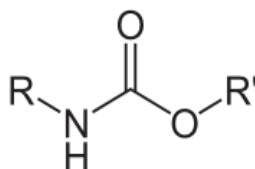


De nombreuses études ont été menées sur les résidus d'organophosphorés dans l'eau. Elles ont toutes montré que ces pesticides étaient détectés moins fréquemment que les autres catégories de pesticides. En effet, les temps de vie calculés dans l'atmosphère sont courts, s'étalant de quelques minutes à quelques heures. Des transports de longues distances ne sont donc pas attendus pour ces composés et les dispersions locales et régionales seront limitées. Les propriétés physico-chimiques des organophosphorés étudiés sont présentées dans l'annexe 1.

Concernant leurs applications, le Chlorpyrifos et le Dichlorvos sont des insecticides utilisés dans différents types de cultures : légumières (chou, pomme de terre, betterave), arbres fruitiers (pommier), ainsi qu'en viticulture. Le deuxième a l'avantage d'être peu persistant par comparaison avec d'autres pesticides organophosphorés. Il sert également au traitement des locaux de stockage et des denrées entreposées. La Phosalone et le Méthylparathion sont des insecticides employés pour la protection de grandes cultures : Betterave, céréales, pomme de terre, mais aussi pour la protection de la vigne et des arbres fruitiers. Ils sont souvent utilisés en combinaison.

I.5. Les carbamates

Les enquêtes de produits chimiques qui exercent une action anticholinestérasique sur le système nerveux semblable aux composés organophosphorés a conduit dans les années 1950 au développement des insecticides carbamates. Les carbamates sont des dérivés de carbamate, HOC(O)NH_2 . Ils ont la formule générale indiquée ci-dessous où R' et R sont des hydrocarbures aromatiques et / ou des groupements aliphatiques (<http://www.health.qld.gov.au>).



Les carbamates sont utilisés dans le monde entier pour combattre les insectes, les champignons, les mauvaises herbes, et en tant que régulateurs de croissance. Les structures de deux carbamates, propoxur et chlorprophame, sont présentées dans la figure 4, et leurs propriétés physico-chimiques sont résumées dans l'annexe 1.

Les carbamates peuvent être utilisés comme insecticides, herbicides et fongicides.

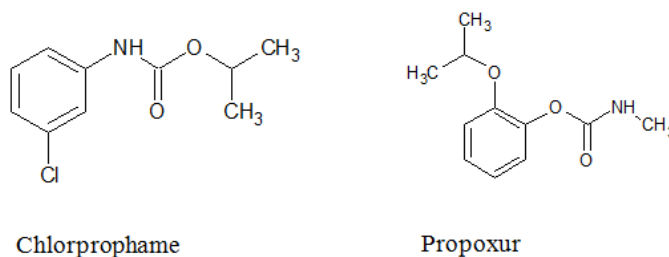


Figure 4 : structures de deux carbamates

Ces insecticides agissent sur le système nerveux des insectes (par contact, inhalation, ou voie systémique) en inhibant la cholinésterase. De même les fongicides bloquent la division cellulaire (systémique). Alors que les herbicides perturbent la division cellulaire et la physiologie des plantes (produits systémiques).

I.6. Toxicologie des pesticides

I.6.1. 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 (www.observatoire-pesticides.gouv.fr).

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. Certains pesticides et leurs produits de dégradation ont été identifiés comme des agents susceptibles de



nuire à la fertilité masculine en particulier via une toxicité testiculaire (Sánchez-Peña et al, 2004). Il a été effectivement mis en évidence qu'une exposition à certaines substances pouvait entraîner un dérèglement du système immunitaire (Rekha et al, 2006). Certains pesticides sont aussi considérés comme étant des perturbateurs endocriniens, c'est-à-dire qu'ils interfèrent avec les hormones en simulant leur action.

I.6.2. Étude de l'activité biologique des organophosphorés

La toxicité de l'activité insecticide organophosphoré et les esters carbamates aux insectes et mammifères est attribué à leur aptitude à inhiber l'acétylcholinestérase, qui est une classe d'enzymes qui catalyse l'hydrolyse de l'agent neurotransmetteur l'acétylcholine (ACh). L'inhibition de l'acétylcholinestérase et connexes estérases, souvent appelées hydrolases à sérine, a été clairement démontrée d'être le résultat d'une réelle réaction chimique entre l'enzyme et le composé organophosphoré ou un ester de carbamate. Le phosphorylée ou une enzyme carbamylée n'est plus capable d'effectuer l'hydrolyse de l'acétylcholine, ce qui se traduit par une accumulation du neurotransmetteur dans la synapse neuromusculaire nerf ou jonction.

Les organophosphorés sont représentés par une grande variété de structures chimiques. La toxicité de ces matériaux pour les insectes et les mammifères est déterminée par un certain nombre de facteurs qui peuvent influencer sur les insecticides car ils sont absorbés, une translocation vers le site cible, et par conséquent ils inactivent la cible, ce qui conduit à l'empoisonnement.

Cette partie explique le mode de l'action d'esters organophosphorés, en mettant l'accent sur les exigences structurales nécessaires pour l'inhibition de l'AChE.

L'acétylcholinestérase

Avant d'entrer dans une discussion sur l'inhibition de l'AChE par des esters organophosphorés et des carbamates, il convient d'abord de fournir une brève revue de l'enzyme. AChE a été isolée à partir d'un large éventail d'animaux, y compris les mammifères, les oiseaux, les poissons, les reptiles et les insectes (Karczmar, A. G. et al, 1970). Il est responsable de la rapide dégradation par hydrolyse de l'acétylcholine de neurotransmetteur dans la choline inactif produits et de l'acide acétique, en tant que c'est indiqué dans le schéma 1.

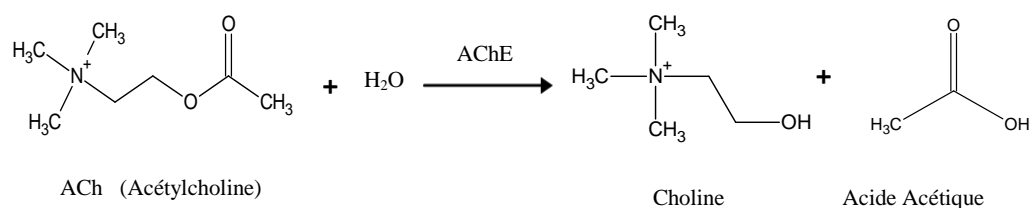


Schéma 1

L'acétylcholine est l'une des certains nombres d'agents neurotransmetteurs physiologiquement importants, elle est impliqué dans la transmission de l'influx nerveux aux cellules effectrices aux jonctions cholinergiques, synaptique et neuromusculaire. La présence de l'acétylcholinestérase a été démontrée dans une variété de tissus d'origine animale et des enzymes à partir d'un certain nombre de différentes sources, y compris les organes des poissons électriques, des érythrocytes chez les mammifères, le cerveau des insectes et de mammifères, et d'autres tissus. Ces enzymes ont été purifiées et caractérisées. AChE est pratiquement une enzyme ubiquitaire chez les vertébrés, les invertébrés et des mammifères, elle est localisée dans certaines zones du système nerveux central, dans les organes et les glandes qui sont contrôlées par la division parasympathique du système nerveux autonome. Le rôle de l'acétylcholinestérase dans la transmission cholinergique à une jonction synaptique ou cholinergique est représenté dans le schéma élémentaire donné dans la figure 5.

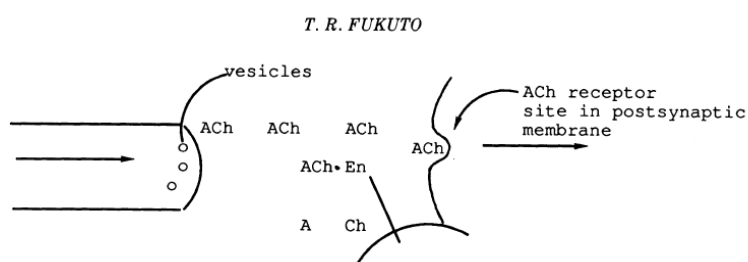


Figure 5 : le rôle de l'AChE et ACh dans la transmission cholinergique.

Lorsque l'influx nerveux d'un neurone se déplace vers le bas et parasympathique atteint une terminaison nerveuse, l'acétylcholine stockée dans des vésicules à la fin est libérée dans la jonction synaptique ou neuromusculaire. En 2 à 3 ms, l'ACh libérée interagit avec le

site récepteur ACh sur la membrane post-synaptique, provoquant une stimulation de la fibre nerveuse ou musculaire. AChE sert comme un agent de régulateur de la transmission nerveuse, en réduisant la concentration d'acétylcholine dans la jonction par hydrolyse catalysée par l'AChE de l'ACh en choline (Ch) et de l'acide acétique (A). Ces produits ne stimulent pas la membrane post synaptique. Dans la figure 5, En désigne l'AChE enzyme; ACh.En est du complexe enzyme substrat, formée préalablement à l'hydrolyse de l'ACh en choline et l'acide acétique. Lorsque l'AChE est inactivée, par exemple, par un ester organique de phosphore, l'enzyme n'est plus capable d'hydrolyser l'ACh, c'est pourquoi la concentration de l'ACh dans la jonction reste élevée, et une stimulation continue du muscle ou de la fibre de nerf se produit, ce qui entraîne finalement un épuisement et tétanie.

Basé sur un certain nombre d'études (Cohen, J. A. et al, 1963), un mécanisme possible pour l'hydrolyse AChE catalysée par l'ACh est présenté dans la figure 6.

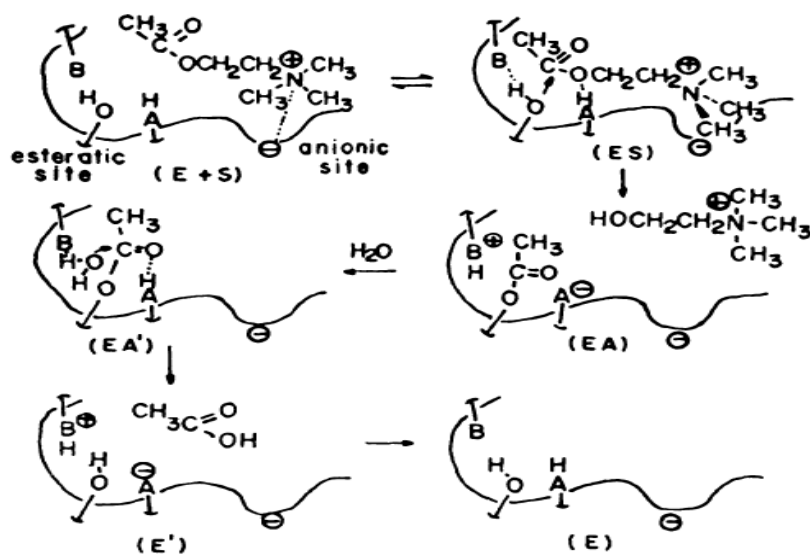


Figure 6 : Mécanisme d'hydrolyse de l'acétylcholine par l'acétylcholinestérase

L'ACh est attirée sur le site actif de l'enzyme par l'attraction électrostatique entre la charge positive sur l'atome d'azote de l'ACh et celle négative dans le site anionique (structure E + S), d'où la formation du complexe enzyme-substrat (ES).

L'acétylation de la sérine hydroxyle (OH) sur le site estérasique est catalysée par le fragment basique d'imidazole (Histidine) B et le fragment acide AH (Tyrosine hydroxyle), conduisant à l'enzyme acétylée EA. La désacétylation s'effectue alors très rapidement, provoquant ainsi

l'enzyme libre (E) en quelques millisecondes. Comme il est indiqué précédemment, l'hydrolyse de l'ACh par AChE a les éléments d'une réaction catalysée par un acide-base, comprenant à la fois la réaction d'acétylation et de désacétylation. La charge négative au niveau du site anionique est attribuée au anion carboxylate de l'acide aspartique ou glutamique. Les étapes de réaction données dans la figure 6 donnent une présentation élémentaire du site actif de l'AChE et d'un mécanisme raisonnable pour l'hydrolyse de l'acétylcholine. L'enzyme est en réalité une protéine très complexe, ayant en plus des sites estérasique et anioniques, un certain nombre de sites périphériques et des zones hydrophobes (Rosenberry, T., 1975). Alors que la discussion qui précède a mis l'accent sur AChE, il convient de souligner qu'il existe au moins un autre type d'enzyme cholinestérase côté AChE, à savoir pseudo-cholinestérase. L'AChE est la plus haute spécificité pour ACh de tout autre ester de choline et pseudo-cholinestérase a la plus forte spécificité pour butyrylcholine. Le rôle physiologique de pseudo-cholinestérase chez les animaux n'est pas aussi bien définie que celle de l'acétylcholinestérase (Karczmar, A. G. et al, 1970). Toutefois, les deux enzymes sont inhibées par des esters organophosphorés et des carbamates.

L'inhibition de l'acétylcholinestérase par un ester organique de phosphore (figure 7) a lieu par l'intermédiaire d'une réaction chimique dans laquelle le groupe hydroxyle de la sérine dans le site actif de l'enzyme est phosphorylée d'une manière analogue à l'acétylation de l'AChE (Figure 6, EA). Contrairement à l'enzyme acétylée, qui se décompose rapidement en acide acétique et de l'enzyme régénérée, l'enzyme phosphorylée (figure 8) est très stable, et dans certains cas, il est irréversiblement bloqué en fonction des groupes liés à l'atome de phosphore (R et R') (Aldridge, A. N, 1950).

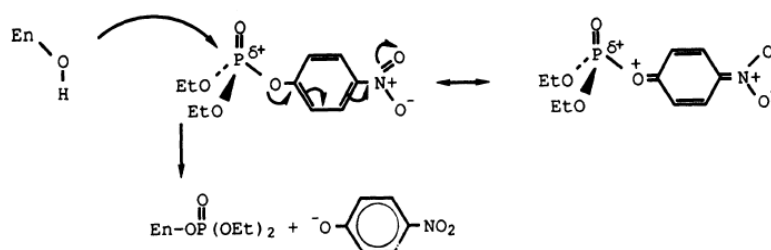


Figure 7 : L'effet d'un substituant attracteur d'électrons sur la réactivité des Paraoxon

Le groupe hydroxyle de la sérine, bloqué par un groupement phosphoryle, n'est plus en mesure de participer à l'hydrolyse de l'acétylcholine. La réaction de l'inhibition a lieu dans un processus en deux étapes, comme indiqué dans le schéma 2.

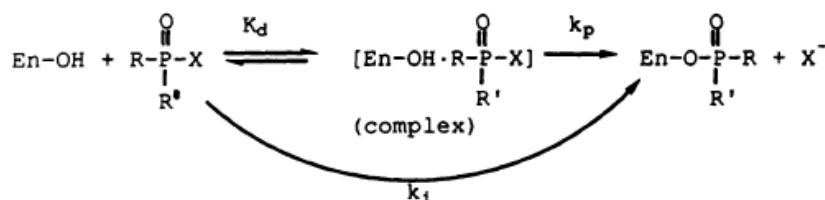


Schéma 2

Dans cette équation En-OH représente AChE dans lequel le groupement hydroxyle de la sérine (-OH) est souligné, R et R' sont une variété de différents groupes (alkoxy, alkyle, amino, thioalkyle, etc), X est le groupe partant, K_d est la constante entre le complexe enzyme inhibiteur et le réactifs de dissociation, k_p est la constante de phosphorylation, et k_i est la constante d'inhibition de vitesse bimoléculaire et K_i = K_p/K_d (Main, A. R, 1964). Comme K_d fournit une mesure de la dissociation du complexe enzyme-inhibiteur, il est considéré comme une estimation pour la liaison et dépend des propriétés structurales et stériques de la molécule. En revanche, la constante K_p de phosphorylation est considéré comme une estimation de la réactivité de l'ester organophosphoré. La constante de vitesse bimoléculaire k_i dépend des valeurs de K_d et k_p et est généralement considéré comme le paramètre le plus utile pour l'estimation de la puissance inhibitrice d'un organophosphoré (et carbamate) anticholinestérasiques. Selon schéma 2, le groupement X est déplacé de l'atome de phosphore par la sérine hydroxyle de l'enzyme et est donc désigné comme le groupe partant.

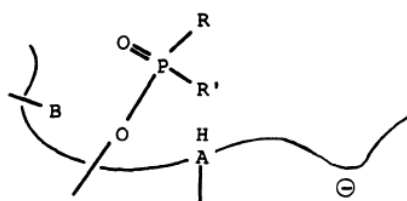


Figure 8: la phosphorylation, et l'inhibition irréversible de l'AChE



I.6.3. Toxicité aiguë et chronique

L'intoxication aiguë se manifeste à la suite d'une exposition unique et de courte durée. Les symptômes apparaissent normalement dans un délai de quelques minutes à plusieurs heures après l'exposition. Le délai d'apparition varie en fonction de la toxicité du produit, de la dose reçue, de la voie d'absorption (orale, cutanée ou respiratoire) et de la sensibilité de la personne. En général, les insecticides présentent une plus forte toxicité aiguë pour l'être humain que les herbicides ou les fongicides. Les signes ou symptômes le plus souvent rapportés lors d'une intoxication aiguë aux pesticides sont des maux de tête, des nausées, des vomissements, des étourdissements, une fatigue anormale, une perte d'appétit et des irritations cutanées, oculaires ou respiratoires. Les intoxications aiguës résultent souvent d'une exposition accidentelle à la suite du non-respect des recommandations en matière d'utilisation ou d'entreposage des pesticides.

Outre les effets à court terme qui peuvent se produire lors d'une exposition à des doses de pesticides relativement élevées, des effets à long terme peuvent aussi être appréhendés. L'intoxication chronique survient normalement à la suite de l'absorption répétée de faibles doses de pesticides pendant plusieurs jours, plusieurs mois ou plusieurs années. Les signes d'une intoxication chronique sont souvent difficiles à reconnaître et leur délai d'apparition peut être relativement long. Parfois, ils peuvent même survenir alors que la personne n'est plus exposée aux pesticides depuis de nombreuses années. Par ailleurs, en raison de cette période de latence caractéristique, il est souvent difficile de faire le lien entre l'exposition chronique aux pesticides et les symptômes observés. Même si les signes ou symptômes d'une intoxication chronique peuvent parfois s'apparenter à ceux d'une intoxication aiguë, certaines études indiquent un lien potentiel entre l'exposition aux pesticides et certains effets néfastes tels que le cancer, les effets sur la reproduction, des perturbations du système endocrinien et du système immunitaire ainsi que des effets neurologiques (Abir KOUZAYHA, 2011).

I.7. Consommation des pesticides au Maroc

En dehors de l'aspect réglementaire, d'après les informations que rapportent les auteurs et responsables de certaines agences, le secteur des pesticides au Maroc demeure parmi les secteurs les moins maîtrisés sur le plan de l'information statistique précise et régulière. Cette situation est due en grande partie d'une part, à l'absence d'une organisation professionnelle regroupant toutes les sociétés intervenant dans l'importation, la formulation et la distribution



des produits phytosanitaires et d'autre part aux importations illicites de ces produits à partir des pays voisins.

Selon l'Association Marocaine des Négociants Importateurs et Formulateurs de produits phytosanitaires (AMIPHY) composée de quinze sociétés membres représentant une part très importante du marché, plus de 600 produits sont importés et commercialisés actuellement au Maroc. Mais cela ne représente en chiffres que 0.017 % de l'utilisation mondiale, alors que les États Unis et la Chine, semblent être de très forts consommateurs de ces produits phytosanitaire. La même source signale que les pays en voie de développement consomment moins de 20 % des pesticides alors qu'ils comptent 50 % de la population mondiale et 46 % des terres cultivées.

D'après les résultats du Recensement Général de l'Agriculture (RGA) de 1996 (MADREF, 1999), les exploitants agricoles au Maroc sont au nombre de 1496000 et ils cultivent une Superficie Agricole Utile (S.A.U) de 8732000 ha. Ce nombre inclut, en fait, un certain nombre de micro exploitations qui ne sont globalement pas susceptibles de répondre aux objectifs de développement visés par les politiques agricoles et qui représentent une SAU de l'ordre de 7%.

L'agriculture pratiquée dans l'Ouest du Maroc nécessite une utilisation de produits phytosanitaires par unité de surface plus élevée que dans l'Est où la culture des céréales est dominante et nécessite peu de pesticides par unité de surface. Selon des données publiées par le Secrétariat d'Etat Chargé de l'Environnement (REEM, 2001), les pesticides importés, prêts à l'emploi, représentent 87% du marché phytosanitaire. Ce volume peut atteindre des valeurs nettement supérieures en cas d'invasion acridienne (exemple en 1988 : 16894 tonnes).

Tandis que les pesticides produits localement ne représentent que 13% du volume global annuel. Sur le marché marocain, les insecticides représentent 38% des ventes, suivis des fongicides et d'herbicides avec respectivement 32% et 27% (AMIPHY, 2002).

De manière générale, le volume des ventes des pesticides au Maroc reste très limité dans un marché qui stagne depuis une dizaine d'années à cause du manque des moyens financiers pour les agriculteurs et des conditions climatiques aléatoires qui rendent les prévisions d'approvisionnement très difficiles(EL BAKOURI H.,2006).

I.8. Les intoxications relevées par les pesticides au Maroc

Les statistiques concernant les intoxications des animaux sont presque inexistantes. Ceci est



dû au fait qu'il est souvent très difficile de faire le diagnostic de certitude. Chez l'homme, depuis 1980 et suite à une circulaire ministérielle, la déclaration de tous les cas d'intoxications par les médecins est devenue obligatoire. Le Centre Antipoison à lui seul recueille actuellement plus de 20000 cas d'empoisonnements par an. Ces données sont enregistrées dans des fiches de toxicovigilance et leur traitement s'effectue par des moyens informatiques qui permettent, la gestion épidémiologique de ces données et l'évaluation des risques dans le but d'élaborer un programme de prévention. Sur l'ensemble des intoxications aiguës colligées au Centre Antipoison du Maroc pour une période étalée sur 25 ans à partir de 1980, 158903 cas d'intoxications ont été enregistrés et les pesticides ont été incriminés dans 7833 cas soit 4.9% (EL BAKOURI H., 2006).

II. Intoxication par Phostoxine

II.1. Définition

Phostoxine ou phosphore d'aluminium est un raticide solide utilisé dans l'agriculture, pour éliminer les insectes et les rongeurs dans leurs entrepôts céréales. Il est généralement présenté sous forme de comprimé de trois grammes (figure 9), en ferme dans des flacons hermétiques pour maintenir leur fraîcheur et leur activité. Il est largement utilisé, car il est très actif, facile à produire, d'un prix abordable et surtout, ne laissant pratiquement aucun résidu dans les denrées alimentaires soumises à la fumigation après aération (Assiya Ahmed Laaziz, 2012). L'intoxication par le phostoxine indique généralement une hypoxie avec des lésions traumatiques évidentes au niveau du tractus gastro-intestinal, du foie, des reins et du système nerveux central (Khosla S. N et al, 1992). La dose létale du phosphore d'aluminium chez l'homme est estimée à 1500 mg (Mlle Hasna BENJRAD, 1999).



L'administration de phostoxine par voie orale est souvent volontaire dans un but suicidaire, dans ce cas le contacte du A1P avec le liquide gastrique provoque le dégagement de la phosphine qui bloque la chaîne respiratoire.

Le comprimé est à base d'aluminium et de phosphore, donc la décomposition du produit à l'intérieur de l'organisme fait augmenter le taux du phosphore dans le sang d'une valeur normale de 25-45mg/l à une valeur supérieur ou égale à 76,3mg/l, et l'aluminium d'une valeur de 9-15µg/l à une valeur de 1537,5 µg/l.

L'accumulation de l'aluminium dans les tissus et les organes humains entraîne des lésions musculaires et une substitution du calcium des os, d'où une plus grande fragilité de ceux-ci. L'aluminium est un bon indicateur d'intoxication par le phostoxine.

II.2.2. voie nasale

L'intoxication par voie respiratoire ne fait pas intervenir l'aluminium, c'est plutôt la phosphine qui est inhalé et c'est elle qui cause des effets nocifs grâce à ces propriétés physiques et chimiques. L'intoxication par inhalation est souvent accidentelle, est due à la mauvaise utilisation du produit, ou à la banalisation de ce dernier. Pour les deux voies, c'est la phosphine qui réagit en bloquant le métabolisme grâce à ces propriétés chimiques.

La phosphine

La phosphine est le nom commun d'un gaz constitué d'hydrure de phosphore (dont le nom officiel et international est la phosphane). Il s'agit d'un gaz incolore, très toxique et inflammable (utilisé pour ces raisons comme agent de fumigation à des fins biocide), son point d'ébullition est de l'ordre de -88°C à 1 atm. La phosphine pure est inodore, mais la « phosphine technique » a une odeur extrêmement déplaisante évoquant l'ail ou le poisson pourri, à cause de la présence de « phosphine substituée » et de diphosphine (P₂H₄).

Sa formule est PH₃. Elle résulte de l'action d'un acide, ou de l'humidité sur un sel d'aluminium (phosphure d'aluminium) ou de magnésium (phosphure de magnésium).

Propriétés physico-chimique :

La phosphine est un gaz explosif, s'enflamme spontanément dans l'air si la concentration



dépasse sa limite inférieure d'inflammation qui est de 1,8%.

Ce gaz a la particularité de corroder certains métaux tels que le cuivre, l'argent et l'or.

Le phosphore d'hydrogène a une densité très proche de celle de l'air, d'où sa rapide diffusion qui nécessite sa mise en œuvre dans des locaux adaptés permettant de réaliser une enceinte étanche autour de la denrée soumise à la formation (Fumées désinfectantes ou toxiques répandues pour assainir une pièce).

II.3. Devenir dans l'organisme

Après libération de la phosphine dans l'estomac, le phosphore d'hydrogène est rapidement absorbé dans le tractus gastro-intestinal par simple diffusion.

Il atteint presque tous les appareils : gastro-intestinal, cardiovasculaire, respiratoire, hépatobiliaire, rénal ainsi que le système nerveux central (YADAV J, 1997). Le phosphore d'hydrogène est métabolisé en phosphates, hypophosphite et en phosphite (EPA, 1995).

Ces métabolites sont éliminés par voie urinaire tandis qu'une petite partie de PH_3 est libérée sous forme inchangée par les poumons. Elle peut être d'ailleurs détectée en plaçant des bandelettes de nitrate d'argent au contact de l'haleine buccale (SINGH S. et al, 1996).

II.4. Mécanisme d'action

Le AIP est un poison mitochondrial, agit au niveau de la chaîne respiratoire, provoque le blocage de la cytochrome-C-oxydase et d'où le blocage du transfert d'électron, et l'inhibition de la phosphorylation oxydative (GOSWAMI M. et al, 1994). C'est un poison métabolique qui entraîne un blocage non compétitif du cytochrome c-oxydase mitochondriale. Il agit comme une toxine cellulaire par inhalation de la catalase. L'inhibition de transfert d'électrons stimule la production du radical d'oxygène libre dont la concentration est encore augmentée par l'accumulation, due à l'hypoxie cellulaire, des cofacteurs réduits.

L'induction du superoxyde dismutase et l'inhibition de la catalase vont entraîner une



surcharge excessive en H_2O_2 .

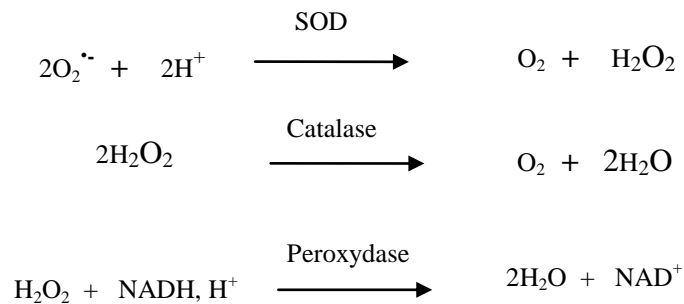


Figure 10: les trois enzymes inhibées par le phosphore d'aluminium

L'eau oxygénée franchit directement la membrane cellulaire, provoque ainsi la dénaturation de la protéine membranaire et la peroxydation des lipides. Il peut réagir indirectement avec la membrane lipidique et produire des radicaux hydroxyles par différents mécanismes. Donc, la peroxydation lipidique, une fois initiée, produira davantage des radicaux d'oxygène, créant ainsi un cercle vicieux.

Enfin, le blocage de transfert d'électrons a comme conséquence la rupture de la chaîne respiratoire et donc l'inhibition de la phosphorylation oxydative qui se manifeste par une crise énergétique cellulaire.



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah

Faculté des Sciences et Techniques

www.fst-usmba.ac.ma



Chapitre II

Les techniques d'analyses de pesticides



I. Introduction

Depuis qu'ils ont été mis au marché, les pesticides ont rendu un grand service à l'homme notamment dans le secteur agricole ainsi que dans la santé publique en luttant contre des vecteurs des maladies, mais leur utilisation n'est pas sans danger pour l'homme.

L'objet de ce travail est de procéder en premier lieu à l'évaluation des certains toxiques organiques particulièrement des organochlorés, organophosphorés, phostoxine par la chromatographie sur la couche mince et en deuxième lieu est de procéder à la validation d'une méthode analytique qui permet de doser les pesticides organochlorés et les organophosphorés et le phostoxine dans le sang et liquide gastrique et/ ou milieu biologique facilement accessible par chromatographie gazeuse couplée à la spectromètre de masse ainsi d'insister sur les difficultés analytiques rencontrées lors du choix de la méthode et de l'interprétation des résultats.

II. Techniques utilisées et analyse des échantillons

II.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

II.1.1. Généralités

Il s'agit d'une technique où les molécules sont identifiées en fonction de leur position de migration et de leurs couleurs en fonction du composé cherché. Le produit est déposé sur une plaque recouverte de phase stationnaire (gel de silice) et sa migration est réalisée dans une chambre à développement (la cuve) au moyen d'un mélange de solvants appropriés (phase mobile). Cette technique permet la détection des pesticides (organophosphorés, organochlorés ou carbamate).

II.1.2. Principe de fonctionnement

La chromatographie sur couche mince, ou sur plaque (CCM), est effectuée surtout en vue d'une analyse d'un mélange. Bien que le principe de la chromatographie sur couche mince

soit connu depuis plus d'un siècle son essor en tant que méthode analytique a été pris il y a seulement 35 ans, grâce notamment aux travaux d'Egon Stahl en 1967. La phase stationnaire solide est fixée sur une plaque, et la phase mobile liquide, nommée éluant, est un solvant ou un mélange de solvants.

On dépose sur la phase fixe une petite quantité du mélange à séparer et on met cette phase au contact de la phase mobile. La phase mobile migre de bas en haut, par capillarité, le long de la phase fixe en entraînant les constituants du mélange. C'est le phénomène d'élution, qui permet la séparation des constituants du mélange à analyser. Chaque constituant migre d'une certaine hauteur, caractéristique de la substance, que l'on appelle rapport frontal ou rétention frontale (R_f) :

$R_f = \text{hauteur de la tache} / \text{hauteur du front du solvant}$

Chaque tache correspond à un constituant et on l'identifie par comparaison du R_f avec un témoin (une même substance migre à la même hauteur dans des conditions opératoires identiques; même R_f) (Nshimiyimana F., 2010).

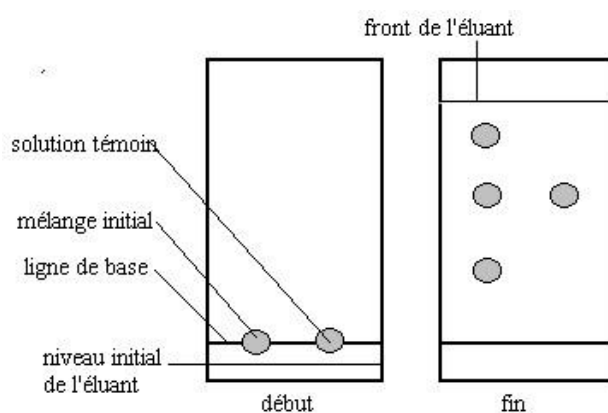


Figure 11 : plaque de chromatographie (<http://webetab.acbordeaux.fr>)

II.2. Chromatographie Gazeuse couplée au spectre de masse (GC-MS)

II.2.1. Généralités

C'est une méthode d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse afin d'identifier et/ou de quantifier précisément de

nombreuses substances. Les applications de la GC-MS comprennent le dosage de médicaments, l'analyse environnementale et l'identification de toutes substances inconnues même sous forme de traces. La GC-MS est d'ailleurs présentée comme étant le « gold standard » des analyses en médecine légale.

II.2.2. Principe de fonctionnement

A cause de la température élevée dans la chambre d'injection (injecteur), les composés passent instantanément à l'état vapeur et sont poussés par le gaz vecteur (hélium) vers la colonne chromatographique qui l'apporte à la phase stationnaire, alors les composés sont retenus à cette phase en fonction de leur polarité avec la phase stationnaire. Cependant un détecteur positionné à la sortie de la colonne détecte les composés sortant de la phase stationnaire et transmet l'information sous forme d'un signal électrique à l'enregistreur. Après avoir être séparé, les composés sont dirigés dans une source ionique à impact électronique émis par un filament. Ces électrons ionisent les composés qui peuvent être fragmentés. Les ions des molécules parents et des fragments sont séparés suivant leur masse/charge dans l'analyseur du spectromètre de masse et après ils sont reçus par le détecteur. Alors le spectre issu du traitement du signal envoyé par le détecteur est finalement affiché. La gamme de masse analysée est 35-500 uma (Rouessac 2000 et Guilloteau, 2007).



Figure 12: Appareil GC-MS

La spécification de la technique GC-MS est résumée dans l'annexe 2.



II.3. Analyse de phostoxine par spectrométrie d'absorption atomique

II.3.1. Généralité

La spectrophotométrie d'absorption atomique est essentiellement une méthode d'analyse quantitative qui permet de doser une soixantaine d'éléments chimiques à l'état de traces (en très faible quantité ; ppm) contenus dans une solution. Elle est en outre la technique la plus utilisée actuellement, elle s'adapte bien à toutes matrices biologiques et environnementales. La SAA couvre un vaste éventail d'applications : l'analyse des eaux, des tissus végétaux et animaux, des aliments et boissons, des sols, engrais et sédiments, des liquides biologiques (Nakib 2009).

II.3.2. Principe

Le spectre d'émission atomique traverse le lieu d'atomisation par la source lumineuse, une partie de la lumière incidente est absorbé par les atomes résultants d'une dissociation thermique. La qualité de l'analyse dépendra principalement de la concentration atomique, donc le rendement de l'atomisation. Le milieu absorbant doit en conséquence contenir la plus haute densité possible d'atomes à l'état fondamentale, tout en conservant une proportionnalité entre cette concentration et celle de l'élément dans l'échantillon soumis à l'étude (Benjard 1999).



Figure 13 : spectrométrie d'absorption atomique à four

En effet, le principe de la SAA repose sur les propriétés des atomes à être excités. Cette méthode d'analyse permet de doser des éléments chimiques à l'état de trace ou en très faible concentration, contenus dans une solution.

C'est une technique qui s'est largement développée ces dernières années, elle est actuellement d'utilisation courante pour le dosage des métaux lourds (Pb, Cd, Al, Zn,..) dans les différentes matrices que ce soit l'eau, sédiment, aliment, sang, urine et liquide gastrique.

La spectrométrie d'absorption atomique étudie les émissions ou absorptions de la lumière par l'atome libre, c'est-à-dire les atomes absorbent leur propre énergie par le passage d'un de ses électrons d'une orbite électronique à une autre. Généralement seuls les électrons externes. Elle présente de nombreux avantages ; haute sensibilité, grande spécificité, rapidité, faible quantité de matière première, facilité de préparation des solutions étalons et faible cout de l'instrumentation (Nakib 2009). La spectrométrie d'absorption atomique fonctionne avec deux procédés différents :

- La flamme qui a pour objet d'analyser des éléments en abondance, le gaz vecteur ainsi utilisée est l'acétylène.
- Le four est désigner à analyser des éléments à l'état de traces, il utilise l'argon ou l'azote comme gaz vecteur.



La loi d'absorption en absorption atomique

L'intensité de l'absorption dépend directement du nombre de particules absorbant la lumière selon la loi de Beer Lambert selon laquelle l'absorbance est proportionnelle au coefficient d'absorption spécifique a , au trajet optique b et à la concentration c .

$$A = abc$$

Où $A = \log \frac{I_0}{I}$

I = intensité après absorption par les atomes.

I_0 = intensité initiale de la source lumineuse.

Cependant en pratique, cette relation n'est pas toujours vérifiée. On n'obtient pas toujours une droite d'étalonnage. C'est le cas si la concentration devient trop élevée. La gamme de dosage est le domaine dans lequel la droite d'étalonnage est pratiquement une droite. Il est limité pour les faibles concentrations par la limite de détection et pour les fortes concentrations par l'erreur sur la fidélité : à une très forte variation de la concentration correspond une faible variation de l'absorbance. La gamme de dosage est généralement donnée par le constructeur. Elle dépend de la raie de dosage utilisée. **Appareillage** (voire annexe 3)

II.4. Préparation des échantillons

II.4.1. Prélèvements

Les prélèvements d'autopsie présentent des particularités de point de vue qualitatif et quantitatif par rapport aux autres prélèvements biologiques.

Les conférences de consensus internationales ont permis d'établir une liste des prélèvements obligatoires dans le domaine médico-légal ainsi qu'une liste des prélèvements facultatifs. Pour notre laboratoire on préconise les prélèvements liquides biologiques suivants :

- **Sang cardiaque** : présente l'avantage de pouvoir être aisément prélevé, en quantité importante.
- **Sang périphérique** : intra-iliaque, fémoral ou orbital sous clavier, additionné de fluorure de sodium (1% à 2%). Il devra être totalement rempli.



- **Urines** : c'est le liquide biologique de choix, de par sa pureté (98% d'eau) et sa simplicité, pour un dépistage rapide par immuno-analyse pour quelques familles de toxiques.
- **Liquide gastrique** : présente l'avantage d'être souvent abondant, il permet parfois de retrouver le produit recherché non métabolisé.
- **Bile** : prélevée à la seringue, conditionnée dans un flacon en verre, la bile est particulièrement intéressante en absence d'urine et compte tenu du cycle entérohépatique de nombreuses molécules et de leurs métabolites qui se trouvent à des concentrations très supérieures aux concentrations sanguines et persistent plus longtemps que dans le sang.
- **Poumon** : surtout pour les toxiques volatils pouvant être introduits dans l'organisme par voie respiratoire.
- **Les reins** : sont particulièrement indiqués dans la recherche des intoxications chroniques aux métaux lourds.
- **Le foie** : siège principal du métabolisme de nombreux xéno biotiques est intéressant en l'absence de sang et de bile de par cycle entéro-hépatique.
- **Cerveau** : présente un intérêt particulier pour les substances lipophiles à tropisme cérébelleux de plus, dans la boîte crânienne, relativement étanche, on peut retrouver des composés volatils ayant disparu des autres organes lors du phénomène de liquéfaction putréfactive.
- **Les cheveux** : les phanères présentes l'avantage d'une conservation exceptionnelle et à température ordinaire.

Autres les prélèvements biologiques, le matériel nécessaire pour effectuer ce travail se compose essentiellement de :

- ✓ Solvants organiques : hexane, dichlorométhane, méthanol, acétone, chloroforme.
- ✓ Solution HCl et une autre de NaOH.
- ✓ Sulfate anhydre et Florisil.
- ✓ Flacons en verre
- ✓ Capsules en porcelaine
- ✓ Tubes à essais
- ✓ Seringues
- ✓ Micropipettes
- ✓ Plaques chromatographiques

- ✓ Lampe UV
- ✓ Brodifacoum : appâts 50g (0,005%).
- ✓ Alphachloralose : poudre

II.5. Analyse des matrices biologiques par CCM

Les échantillons nécessaires pour effectuer cette analyse, sont reçus au département de toxicologie de l'institut National d'hygiène (viscères : sang, liquide gastrique, urines etc.) dans le cadre du programme national du médico-légal, conservés au réfrigérateur avant l'extraction. Au cours de ce stage nous avons analysé 20 échantillons des matrices biologiques (sang, liquide gastrique).

II.5.1. Méthode d'analyse

Extractions

L'extraction des organophosphorés, carbamates, et organochlorés se fait sur un échantillon de 10 à 20 g où sont épuisés par l'éther diéthylique dans un milieu acide (Extraction acide, HCl 0.1N), même chose pour les benzodiazépines, les alcaloïdes, et le Takaout mais dans un milieu basique (Extraction basique, NaOH 40%) .

Après au moins 12h d'incubation, on récupère le surnageant qui sera par la suite évaporé à sec dans une capsule. Les résidus secs sont récupérés dans 2 ml d'éther diéthylique qui par la suite seront déposés sur les plaques de gel de silice (phase stationnaire).



Figure 14 : Extraction en milieux acide et basique



II.5.2. Préparation des cuves et plaques

- Les cuves

Tableau 1 : solvants constituant l'éluant de chaque cuve

Les cuves	Eluant
Organophosphorés	Hexane 40 ml plus acétone 10 ml
Organochlorés	Ether de pétrole
Carbamates	Chloroforme 90 ml plus acétone 10 ml
Benzodiazépine	Chloroforme 35 ml plus 15 ml d'acétone
Alcaloïdes et Takaout	Méthanol 50 ml plus 0.75 ml d'ammoniaque

- Les révélateurs

Tableau 2 : Différents révélateurs des toxiques recherchés

Les toxiques recherchés	Révélateurs
Organophosphorés	Chlorures de palladium à 0,5%
Organochlorés	Ethanolamine pur, sécher la plaque puis pulvériser avec nitrate d'argent à 1/10
Carbamates	Diéthylamine pur, sécher la plaque puis pulvériser le mélange à volumes égales de chlorure mercuriques et diphénylcarbazon
Benzodiazépine	Na ₂ SO ₄ anhydre
Alcaloïdes et Takaout	Réactif de Meunier (iodoplatinate)

Les plaques de gel de silice (phase stationnaire) sont placées dans les cuves contenant les éluant (phase mobile) cité ci – haut qui entraîne la migration verticale. Cette dernière est fonction de la polarité des substances, de la polarité de l'éluant (phase mobile) et du pouvoir d'adsorption de la phase stationnaire.

Après migration et séchage, la plaque peut être examinée sous UV à 365 nm. Dans le cas où l'observation en UV ne paraît pas suffisante, on peut compléter ces résultats en pulvérisant le

chromatogramme par les révélateurs chimiques des toxiques étudiés qui sont indiqués dans le tableau 2.

II.6. Analyses par GC-SM

Extraction et purification

Dans notre travail, nous avons procédé à deux méthodes de séparation avant de faire passer les échantillons dans la GC-MS, on commence par l'extraction puis on passe à la filtration.

On prépare un mélange contenant 10 ml d'acide chlorhydrique et 10 ml d'éther diéthylique plus la matrice biologique (le sang, le liquide gastrique) qu'on veut analyser. On ferme le flacon contenant l'échantillon avec un papier aluminium et on le laisse sous l'hôte pendant 24 heures, puis on prélève le surnageant et dans un tube on le mélange avec 20 g du sulfate de sodium (NaSO_3). Ensuite on fait passer le mélange dans tube à florasil, et on récupère la solution dans des viales pour le dosage par chromatographie gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse.

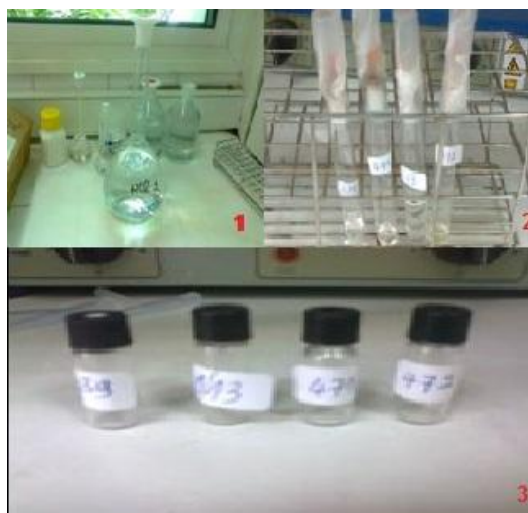


Figure 15 : Préparation des échantillons

- (1) : matériel et produits chimiques utilisés pour l'extraction
- (2) : filtration du surnageant (liquide gastrique, sang)
- (3) : les extraits d'échantillons prêts à être analysés par GC-MS

II.7. Méthode d'analyse de phostoxine



II.7.1. Échantillons

Toute demande d'examen toxicologique devrait être accompagnée par les échantillons biologiques suivants :

- Le sang

L'échantillon de sang devra être transporté avec beaucoup de précautions afin d'éviter toute hémolyse susceptible de gêner la recherche toxicologique.

- le liquide gastrique

Le liquide gastrique est tout à fait indiqué pour la recherche qualitative, car obtenu à grand volume que le sang, ce qui est due à la présence de l'acide chlorhydrique qui catalyse la libération de la phosphine.

II.7.2. Dosage des traces d'aluminium

Le dosage de l'aluminium dans les échantillons de sang et de liquide gastrique en utilisant la spectrométrie d'absorption atomique, est réalisé après la minéralisation des échantillons.

Minéralisation

La minéralisation est une étape importante pour la détermination d'éléments traces. Elle permet de détruire la matière organique et obtenir des solutions contenant la teneur totale des éléments présents dans la prise d'essai (Nakib, 2009).

Le but de la de la prédigestion est d'éliminer la matière organique, avec l'acide nitrique et la chaleur. On met dans un tube 1 ml de sang et on rajoute 1 ml d'acide nitrique pur (60%), dans un autre tube on met 3 ml de liquide gastrique plus 5 ml d'acide nitrique pur (60%) et on les laisse pendant une nuit. La prédigestion se fait soit, dans un four, bain de sable ou bain marie. On place les tubes contenant de les échantillons avec l'acide nitrique dans un bain marie à 80°C pendant 4 à 5h, parallèlement un tube témoin contenant 5 ml d'acide nitrique est soumis au même protocole.



Figure 16 : La minéralisation du sang

- (1) : deux échantillons : sang et liquide gastrique.
- (2) : l'ajout de l'acide nitrique
- (3) : Chauffage des échantillons
- (4) : dosages de l'aluminium

Dilution

Avant de passer au dosage de l'aluminium par SAA, on complète le volume de l'échantillon contenant le liquide gastrique par l'eau distillée jusqu'à 30 ml, pour l'autre tube de sang on le complète jusqu'à 10 ml.

Après la dilution, on introduit 1 ml de chaque échantillon dans les godets placés dans l'appareil. L'injecteur prélève 1 μ l de chaque godet, le dépose dans le brûleur au niveau du tube à graphite.

Lecture de gamme d'étalonnage

Pour obtenir une courbe d'étalonnage, il faut préparer une solution de 75 μ g/l par dilution de solution mère (standard) de concentration 1mg/l en Aluminium de type Merck. On injecte la solution de 75 μ g/l dans l'appareil, les solutions 50 μ g/l et 25 μ g/l sont préparés



automatiquement en obtenant ainsi les trois points permettant de tracer la courbe d'étalonnage (généralement une droite), qui permet de convertir les absorbance en concentration exprimée en $\mu\text{g/l}$.

Dosage d'aluminium

Une fois l'échantillon est déposé au niveau de l'appareil, le prélèvement se fait automatiquement et l'échantillon se trouve au niveau du tube à graphite dans lequel se passe les trois étapes ; l'évaporation, calcination et atomisation.



Résultats & Discussions

I. Résultats

I.1. Résultats d'analyse par CCM

Les résultats d'investigation analytiques que nous avons obtenu sont représentés dans le tableau suivant.

Tableau 3 : Résultats d'analyse par CCM

Échantillons	Matrice biologique	Résultat CCM				
		Pesticides			benzodiazépine	Takaout
		OP	OC	Carbamate		
47	contenu gastrique	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif
48	sang	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif
53	contenu gastrique	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif
60	contenu gastrique	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif
63	sang	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif
65	sang	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif
66	sang	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif
72	sang	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif
74	sang	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif
75	sang	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif
113	contenu gastrique	positif	négatif	négatif	négatif	négatif
114	sang	positif	négatif	négatif	négatif	négatif
115	sang	positif	négatif	négatif	négatif	négatif
116	sang	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif

La plaque suivante montre les échantillons qui ont donné un résultat positif pour les OP par CCM (Figure 17).

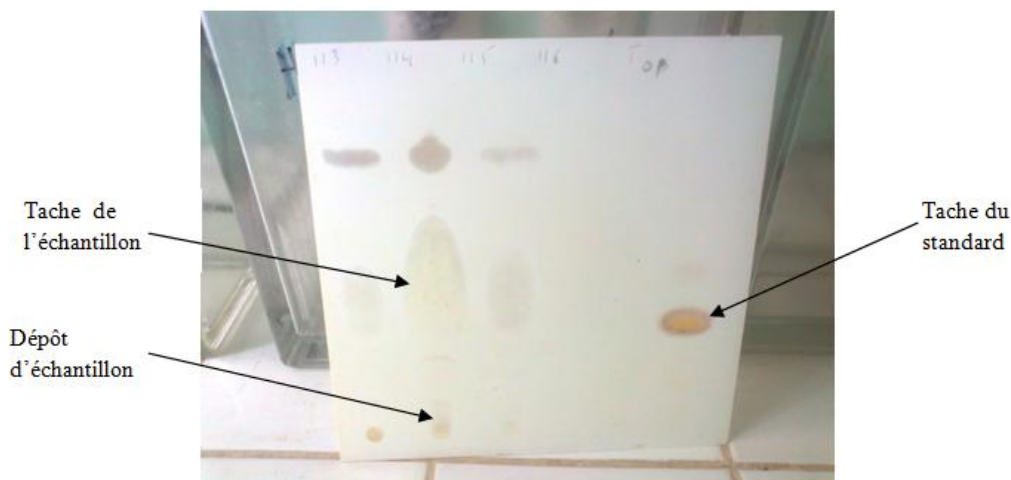


Figure 17 : Plaque CCM des OP

Malgré ses avantages, la CCM ne reste qu'une technique analytique qualitative qui se base sur l'interprétation des taches apparues par UV ou par la pulvérisation qui se fait par les substances chimiques spécifiques aux produits recherchés (dans notre cas, voir matériels et méthodes). Donc cette méthode ne nous permet pas d'identifier le produit révélé par ces 2 méthodes citées ci-haut (pulvérisation ou par UV). Toutefois, il peut y avoir des interférents qui par conséquent peuvent engendrer des résultats faux positifs.

I.2. Résultats d'analyse par GC-MS

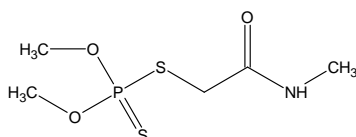
Dans la présente étude, l'objectif est de vérifier s'il y a des pesticides dans les échantillons analysés pour confirmer le rapport du médecin-légiste. Pour que la détection des pesticides soit efficace, il faut bien extraire et purifier l'échantillon à analyser, afin d'éviter d'avoir des chromatogrammes secondaires à la fin de l'analyse d'une part, d'autre part écarter la contamination de la colonne de l'appareil par plusieurs constituants des matrices biologiques étudiées. L'appareil est accompagné d'un système informatique, qui nous permet à travers un logiciel d'identifier et préciser la structure chimique des pesticides existant dans les échantillons. Le logiciel compare entre les fragments de masse des composés analysés et ceux de sa bibliothèque qui possède 30 000 molécules, pour nous donner la structure des pesticides s'ils y en a dans l'échantillon.

L'analyse de quatre échantillons (sang, liquide gastrique) par GC-MS donne les résultats suivants :

Tableau 4 : Résultats d'analyse par GC-MS

Échantillons	Matrice biologique	Résultat GC-MS
472	Sang	Négatif
439	Sang	Négatif
471	Sang	Négatif
1	Sang	Négatif
469	Liquide gastrique	Positif

Les cinq échantillons subissent les mêmes étapes d'extraction et purification, malgré ça leur analyse par GC-MS ne donne qu'un résultat positif (échantillon 469), qui donne un pic vers 12 min (figure 19). Ceci est confirmé par la spectrométrie de masse qui nous permet de déterminer la masse moléculaire du composé identifié, celle-ci est de Dimeton (figure 18) ou O,O-diméthyl S-[2-(méthylamino)-2-oxoéthyl] phosphorodithioate, qui est un organophosphoré de type dithioates, de formule brute $C_5H_{12}NO_3PS_2$ et de masse moléculaire $229.257442 \text{ g.mol}^{-1}$.

**Figure 18** : structure de Dimeton

Les deux figures suivantes montrent le chromatogramme GC-MS de l'échantillon 469 et le spectre de masse de Dimeton.



ROYAUME DU MAROC
MINISTÈRE DE LA SANTÉ
INSTITUT NATIONAL D'HYGIÈNE

22/05/2013 11:49

Rapport d'analyse GCMS

Sample Information

Analyzed by : Admin
 Analyzed : 22/05/2013 10:30:48
 Sample Name : tox469ml2
 Sample ID : tox469ml2
 Injection Volume : 1
 Data File : C:\GCMSsolution\Data\pesticides\tox469ml2.qgd
 Method File : C:\GCMSsolution\Data\pesticides\methodes_pesticides_Scan_220610bis.qgm
 Tuning File : C:\GCMSsolution\System1\Autotuning_EI_200C_10042013.qgt
 Batch File :
 Report File :
 Comment :
 Modified by : Admin
 Modified : 22/05/2013 11:14:49

Chromatogram

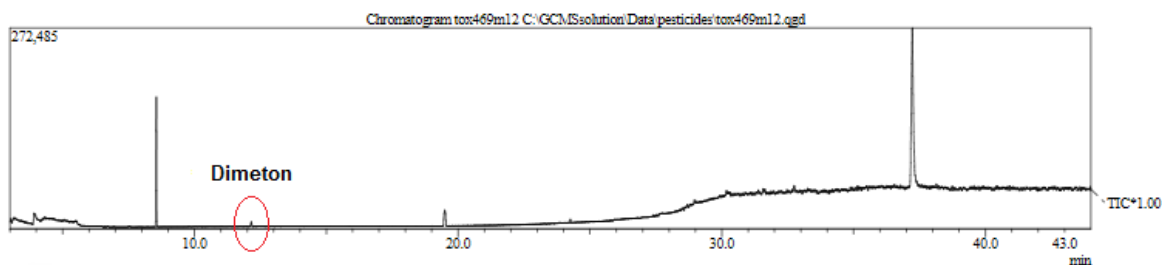


Figure 19 : chromatogramme de l'échantillon 469

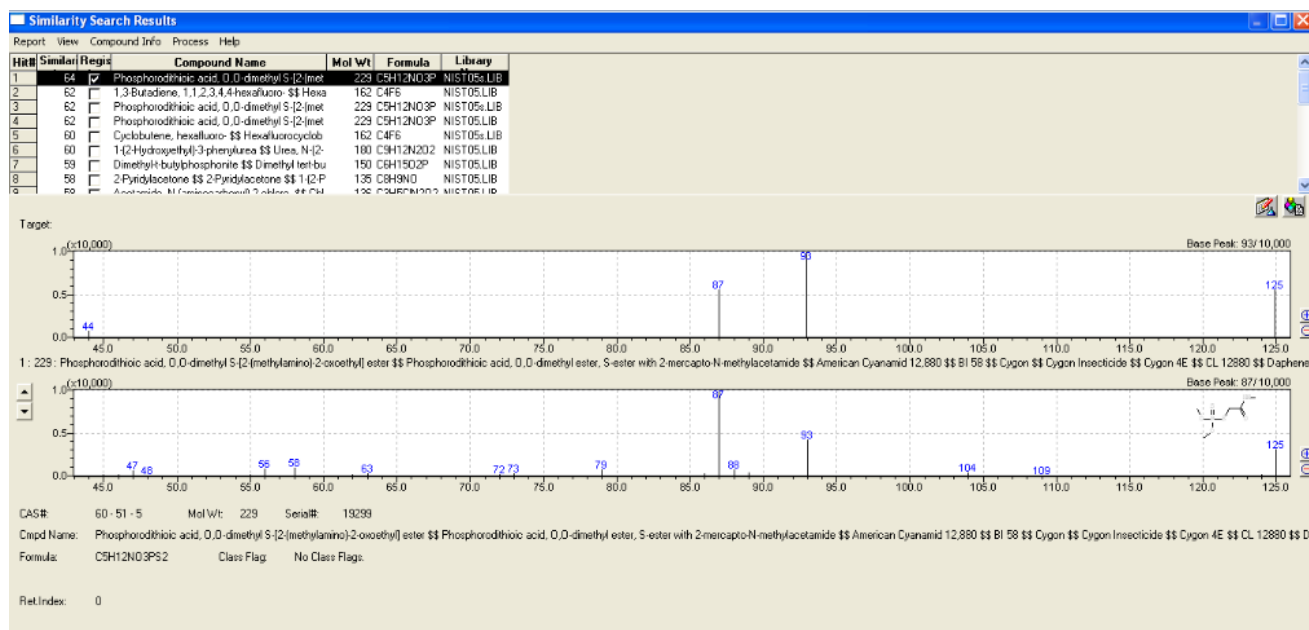


Figure 20 : spectre de masse de Dimeton



Les chromatogrammes des autres échantillons sont indiqués dans l'annexe 4.

I.3. Résultats d'analyse de Phostoxine par spectrométrie d'absorption atomique

On a travaillé sur le sang et le liquide gastrique de trois décès nommés 471, 439 et 358, dont l'étude symptomatique (rapport du médecin légiste) montre qu'ils étaient intoxiqués par le Phostoxine et pour confirmer cette étude on a réalisé le dosage de l'aluminium par spectrométrie d'absorption atomique, les résultats sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 5 : résultats de dosage d'aluminium par SAA

Échantillons	La concentration d'aluminium dans le liquide gastrique ($\mu\text{g/l}$)	La concentration d'aluminium dans le sang ($\mu\text{g/l}$)
471	253,75	273,54
439	3,45	5.32
358	1,65	4.28

-L'échantillon 471 : le taux d'aluminium est très élevé dans le sang et le liquide gastrique.

-L'échantillon 439 et 358 : le taux d'aluminium est très faible dans le sang et le liquide gastrique.

II. Discussion

II.1. Analyse par CCM

Pendant notre étude, nous avons le but d'effectuer des analyses et d'étudier la contamination de la matrice biologique. Notre étude était surtout focalisée sur les analyses des pesticides (les organochlorés, les organophosphorés et les carbamates...), takaout et la benzodiazépine dans le sang et le liquide gastrique en utilisant des méthodes chromatographiques utilisées à l'échelle mondiale. En effet, l'utilisation de la technique CCM pour la recherche de certains



toxiques organiques, avait comme but, d'évaluer le taux d'intoxication par les ces toxiques dans les matrices biologiques (sang et liquide gastrique).

En effet, comme le précise l'OMS, la CCM reste une méthode officiellement encore utilisée dans les différents laboratoires surtout dans le domaine de toxicologie d'urgence vu son prix moindre, sa rapidité et sa simplicité. L'analyse des échantillons que nous avons effectués par CCM ne révèle que trois résultats positif (tableau 3) par simple raison que les autres échantillons ne contenaient probablement que de faibles traces qui restent en dessous de la limite de détection de la CCM ou même l'absence des traces des pesticides. Toutefois, il peut y avoir d'autres produits toxiques, comme les médicaments légaux, qui sont aussi analysés au niveau de l'Institut National d'Hygiène par la technique de la CCM.

On conclut dans ce cas que, soit le patient n'a pas été intoxiqué par les toxiques étudiés (les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, takaout et la benzodiazépine) soit il y a eu la dégradation de ces composés pendant sa conservation, surtout que les OP se dégradent très vite et/ou soit se sont dégradés au cours de l'extraction.

II.2. Analyse par GC-MS

La méthode analytique présentée ici, utilise l'extraction liquide-liquide et le couplage GC/MS, permettant l'identification et le dosage de différents pesticides (organophosphorés, organochlorés et autres) de volatilité, de polarité et de stabilité thermiques variables et souvent impliqués dans des intoxications aiguës. Les différents solvants extractants utilisés, favorisent la rétention de molécules aussi bien polaires qu'apolaires.

Après toutes procédures (extraction, centrifugation, concentration ainsi que l'analyse), l'analyse des échantillons qui ont été injectés ne nous relève qu'un seul résultat positif, c'est le cas de l'échantillon 469 qui contient un produit organophosphoré (Dimeton). On a interprété les pic (figures : 27, 28, 29 et 30) des quatre échantillons qui ont donné des résultats négatif, cela à l'aide du logiciel qui a comparé les spectres de masse des pic avec ceux de sa bibliothèque et ne détecte aucun pesticides. Probablement les autres composés soit n'ont pas été extraits par le mélange de produits (éther, l'acide chlorhydrique), soit ont été dégradés au cours de l'extraction ou bien au cours de prélèvement lors de l'autopsie le temps entre l'autopsie et le stockage dans l'INH, qui peut durer plusieurs jours.



Nous concluons que les travaux futurs devraient se concentrer sur l'amélioration de la récupération, en général par la recherche des effets de matrice telle que celles imposées par la variabilité de la teneur en lipides dans le sang et le liquide gastrique, pour éviter qu'il y ait une formation des émulsions surtout dans le sang. Toutefois, ces méthodologies sont accomplies avec l'équipement standard du laboratoire de l'institut national d'hygiène de Rabat, à savoir GC-MS l'instrument qui permet facilement et rapidement d'effectuer des analyses complexes jusqu'aux éléments de traces. Nous signalons ainsi, qu'il y a des méthodes d'extractions récentes qui sont aussi utilisées pour l'analyse des pesticides à savoir les SPME (Solid phase micro – extraction).

II.3. Analyse de Phostoxine par SAA

Pour l'échantillon 471 :

Le taux d'aluminium est à la fois élevé dans le sang et dans le liquide gastrique, il dépasse la valeur usuelle (9-15 $\mu\text{g/l}$).

Le taux de l'aluminium très élevé dans le sang est expliqué par la décomposition du phostoxine dans l'organisme, et la libération intense de l'aluminium qui avec le phosphore représente 56% de tout le comprimé.

On conclut donc que le décès qui correspond à l'échantillon 471, avait ingéré le comprimé du phostoxine qui en présence de l'acidité et de l'eau, a libéré de la phosphine. Cette dernière est à l'origine de la mort par asphyxie en bloquant la chaîne respiratoire.

Pour les autres échantillons la faible concentration de l'aluminium dans le sang et le liquide gastrique, est due aux mauvaises conditions du prélèvement et aussi le temps séparant le prélèvement de l'analyse.



Conclusion

L'étude bibliographique et expérimentale des pesticide dans deux matrices (sang et liquide gastrique) provenant du corps humain, a permis de construire une importante base de donnée relative aux techniques convenables utilisées pour la détermination qualitative et quantitative des pesticides.

Ainsi, l'ensemble des tests et résultats présentés dans ce rapport montre que les techniques d'analyses par CCM et GC-MS sont adaptées au dosage simultané des Carbamates, OC, OP, dans les matrices biologiques.

Le premier objectif accompli est l'analyse qualitative des pesticides en utilisant la CCM. Pour cela, on a utilisé plusieurs échantillons (sang et liquide gastrique), provenant d'un décès, dont la mort est supposée suite à des intoxications.

Les résultats ont montré certains pics relatifs aux molécules des OP, ce qui veut dire que la mort de 3 personnes parmi les 14 analysés, est due à une intoxication par des organophosphorés. Alors que les échantillons présentant un résultat négatif s'explique soit par la dégradation des pesticides objets d'analyse ou bien par une concentration inférieur à la limite de détection.

Une autre approche a été adoptée pour l'évaluation de l'intoxication, il s'agit de la GC-MS. On a analysé cinq échantillons du sang et de l'acide gastrique, dont un seul échantillon a présenté un test positif, ce qui indique que la mort est due à une intoxication par un OP: le Diméton.

Les cas des décès ne sont pas toujours dus à une intoxication par les pesticides, mais il y on a des intoxications par des raticides. Dans ce cadre on a procédé à la recherche du Phostoxine qui est un raticide caractérisé par la présence de grandes concentrations d'Aluminium dans le sang et le liquide gastrique. Pour cela on a utilisé l'Absorption Atomique comme technique analytique quantitative pour l'analyse de trois échantillons, dont un seul qui a donné un résultat positif.

Annexes

Annexe 1 : Caractéristiques physico-chimiques des quelques pesticides

Les organochlorés

Pesticide	Classe	Mode d'action	Masse moléculaire (g.mol ⁻¹)	Solubilité ^{a,b,c} (mg.L ⁻¹)	LogK _{ow} ^{a,b,d,e}	Pression de vapeur (Pa) ^{a,b,c}	pKa/ Propriété Acide-Base ^f
Aldrin	Organochlorés (cyclodiènes)	Insecticide	364,9	0,027 (27°C)	5,319 (calculé)	0,0086 (20°C)	
DDT-p,p'	Organochlorés	Insecticide	354,5	Prat. insoluble	5,923 (calculé)	2,5 x 10 ⁻³ (25°C)	
DDE-p,p'	Organochlorés		318,03		6,369 (calculé)		
DDD-p,p'	Organochlorés		320,05	0,05 (20°C)	5,389 (calculé)		
Dieldrin	Organochlorés (cyclodiènes)	Insecticide	380,9	0,186 (20°C)	4,879 (calculé)	0,0004 (20°C)	
α-Endosulfan	Organochlorés	Acaricide Insecticide	406,9	0,32 (22 °C)	4,74 (pH 5)		
β-Endosulfan	Organochlorés	Acaricide Insecticide	406,9	0,33 (22 °C)	4,79 (pH 5)		
Endosulfansulfate	Organochlorés		422,95				
α-HCH*	Organochlorés	Insecticide	290,8		3,99 (calculé)		Non-ionisé
β-HCH*	Organochlorés	Insecticide	290,8		3,99 (calculé)		Non-ionisé
γ-HCH* (lindane)	Organochlorés	Insecticide	290,8	8,52 (25°C)	3,5	0,0044 (24°C)	Non-ionisé
Delta-HCH*	Organochlorés	Insecticide	290,8		3,99 (calculé)		Non-ionisé
Heptachlore époxyde			389,3				
HCB**	Organochlorés	Fongicide	284,8	Prat. insoluble	5,66	0,00145 (20°C)	

Les organophosphorés

Pesticide	Classe	Mode d'action	Masse moléculaire (g.mol ⁻¹)	Solubilité ^{a,b,c,g} (mg.L ⁻¹)	LogK _{ow} ^{a,b,c,d,g}	Pression de vapeur (Pa) ^{a,b,c,g}	pKa/ Propriété Acide-Base ^{b,g,f}
Malathion	Organophosphorés	Acaricide Insecticide	330,4	148 (25°C, indépendant de pH)	2,75 (25°C, indépendant de pH)	0,00045 (25°C)	Non-ionisé
Methacrifos	Organophosphorés	Acaricide Insecticide	240,2	400 (20°C)	≥ 3	0,16 (20°C)	
Methidathion	Organophosphorés	Acaricide Insecticide	302,3	200 (25°C)	2,2	0,00025 (20°C)	
Parathion	Organophosphorés	Acaricide Insecticide	291,3	11 (20°C)	3,83	0,00089 (20°C)	Non-ionisé
Diazinon	Organophosphorés	Acaricide Insecticide Nématicide	304,3	60 (22°C, indépendant de pH)	3,69 (24°C ; indépendant de pH)	0,01197 (25°C)	2,6
Dichlorvos	Organophosphorés	Acaricide Insecticide	221	18000 (25°C, indépendant de pH)	1,9 (25°C)	2,1 (25°C)	Non-ionisé
Ethion	Organophosphorés	Acaricide Insecticide	384,5	2 (25°C)	4,28	0,0002 (25°C)	Non-ionisé



Carbamates

Pesticide	Classe	Mode d'action	Masse moléculaire (g.mol ⁻¹)	Solubilité ^{a,b} (mg.L ⁻¹)	LogK _{ow} ^{a,b}	Pression de vapeur (Pa) ^{a,b,c}	pKa/Propriété Acide-Base ^b
Chlorpropham	Carbamates		213,7	110 (20°C ; pH 7)	3,76 (20°C ; pH 7)	0,024 (20°C)	Non-ionisé
Propoxur	Carbamates		209,2	1900 (20°C)	1,56	0,0013 (20°C)	

Annexe 2 : Spécification de la Technique de GC-MS

L'analyse des échantillons transvasés dans les vials est effectuée par chromatographie en phase gazeuse (GC- QP2010 Shimadzu) couplée à un spectromètre de masse (MS-2010 QP model). La colonne utilisée pour effectuer la séparation des composés est une colonne capillaire DB5MS (5 % phényle, 95 % méthyle polysiloxane), de 30 m de longueur, de diamètre interne 0,25 mm et de 0,25 µm d'épaisseur de film.

1 µL d'échantillon est injecté en mode splitless pulsé (20 psi pendant 60 s), avec un débit de purge de 50 ml.min⁻¹ pendant une minute, la température de l'injecteur étant de 220 °C.

Le programme de température utilisé pour les analyses est le suivant : 50°C.min⁻¹, 20°C.min⁻¹ à 180°C, 10°C.min⁻¹ à 190°C, 3°C.min⁻¹ à 240°C, suivi d'un gradient de température jusqu'à 300°C à 10°C.min⁻¹, cette température étant finalement maintenue pendant 5min. Le gaz vecteur utilisé est de l'hélium (8,4 psi Hélium N55) à 1,7 ml.min⁻¹ (débit constant). La température de l'interface entre le GC et le spectromètre de masse est maintenue constante à 200 °C. L'ionisation des composés est effectuée par impact électronique à 70 eV. Les ions sont ensuite séparés par un filtre quadripolaire en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). La détection est réalisée en mode sélection d'ions (SIM, Selected Ion Monitoring) avec les paramètres suivants : dwell time = 80 ms, 1,16 cycles par seconde et tension du multiplicateur d'électrons autotune +400V. Généralement, on utilise la spectroscopie de masse pour mieux identifier les composés que contiennent les échantillons injectés (Miet, 2008).

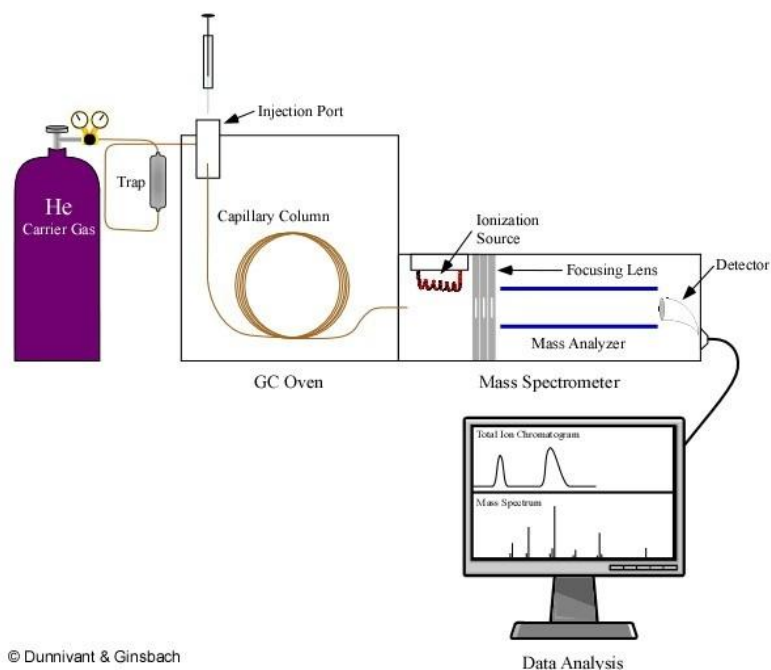


Figure 21 : schéma d'appareil GC-MS (<http://people.whitman.edu>)

Annexe 3 : analyse de phostoxine par spectrométrie d'absorption atomique

Le dispositif expérimental utilisé en absorption atomique se compose d'une source, la lampe à cathode creuse (1), d'un brûleur et un nébuliseur (2), d'un monochromateur (3) et d'un détecteur (4) relié à un amplificateur et un dispositif d'acquisition.

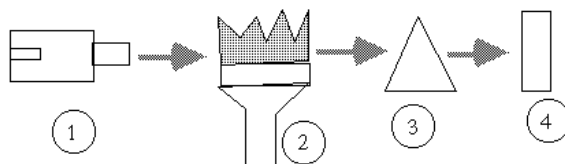


Figure 22 : dispositif de la spectrométrie d'absorption atomique

- La lampe à cathode creuse



La lampe à cathode creuse est constituée par une enveloppe de verre scellée et pourvue d'une fenêtre en verre ou en quartz contenant une cathode creuse cylindrique et une anode. La cathode est constituée de l'élément que l'on veut doser. Un vide poussé est réalisé à l'intérieur de l'ampoule qui est ensuite remplie d'un gaz rare (argon ou néon) sous une pression de quelques mm d'Hg.

Lorsqu'on applique une différence de potentiel de quelques centaines de volts entre les deux électrodes, une décharge s'établit. Le gaz rare est alors ionisé et ces ions bombardent alors la cathode, arrachant des atomes à celle-ci. Ces atomes sont donc libres et sont excités par chocs : il y a émission atomique de l'élément constituant la cathode creuse. La particularité du rayonnement ainsi émis est qu'il est constitué de raies très intenses et très fines.

- Le four ou brûleur

L'échantillon à analyser est en solution. Celle-ci est aspirée au moyen d'un capillaire par le nébuliseur. Une fois l'échantillon est injecté dans le four à graphite, il subit les transformations suivantes :

-Évaporation : une augmentation de la température jusqu'à 110°C pour l'élimination de l'eau.

Le débit de gaz vecteur est $31 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$.

-Calcination : une augmentation spectaculaire de la température jusqu'à 500°C pour la destruction du reste de la matière organique.

-Atomisation : une augmentation de la température jusqu'à 2600°C. Les éléments sont à l'état atomique et le débit du gaz est de $0,1 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$.

- Le monochromateur avec détecteur

Le monochromateur va sélectionner une longueur d'onde particulière du spectre de la cathode creuse, pour cela on réglera la position du réseau ainsi que la fente.

Annexe 4 : les chromatogrammes des échantillons analysés par GC-MS



ROYAUME DU MAROC
MINISTÈRE DE LA SANTÉ
INSTITUT NATIONAL D'HYGIÈNE

21/05/2013 10:34:1

Rapport d'analyse GCMS

Sample Information

Analyzed by : Admin
Analyzed : 20/05/2013 13:20:32
Sample Name : tox1ml13
Sample ID : tox1ml13
Injection Volume : 1
Data File : C:\GCMS\solution\Data\pesticides\tox1ml13.qgd
Method File : C:\GCMS\solution\Data\pesticides\methodes_pesticides_Scan_220610bis.qgm
Tuning File : C:\GCMS\solution\System1\Tune1\Autotuning_EI_200C_10042013.qgt
Batch File :
Report File :
Comment :
Modified by : Admin
Modified : 20/05/2013 14:04:32

Chromatogram

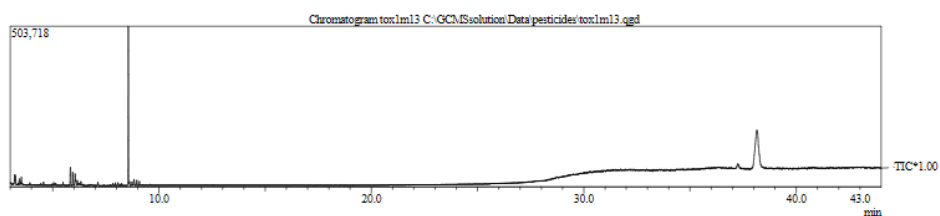


Figure 23 : chromatogramme échantillon 1



ROYAUME DU MAROC
MINISTÈRE DE LA SANTÉ
INSTITUT NATIONAL D'HYGIÈNE

21/05/2013 10:35:1

Rapport d'analyse GCMS

Sample Information

Analyzed by : Admin
Analyzed : 20/05/2013 12:02:34
Sample Name : tox471ml12
Sample ID : tox471ml12
Injection Volume : 1
Data File : C:\GCMS\solution\Data\pesticides\tox471ml12.qgd
Method File : C:\GCMS\solution\Data\pesticides\methodes_pesticides_Scan_220610bis.qgm
Tuning File : C:\GCMS\solution\System1\Tune1\Autotuning_EI_200C_10042013.qgt
Batch File :
Report File :
Comment :
Modified by : Admin
Modified : 20/05/2013 12:46:34

Chromatogram

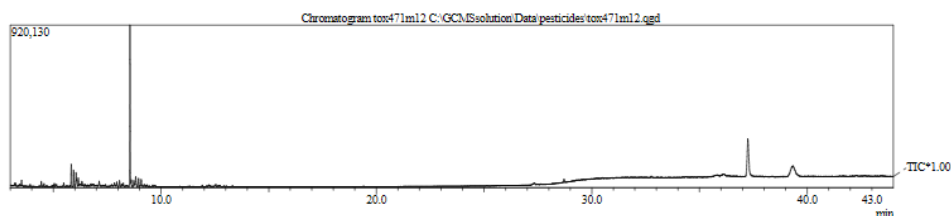


Figure 24 : chromatogramme échantillon 471



ROYAUME DU MAROC
MINISTÈRE DE LA SANTÉ
INSTITUT NATIONAL D'HYGIÈNE

21/05/2013 15:02:37

Rapport d'analyse GCMS

Sample Information

Analyzed by : Admin
Analyzed : 20/05/2013 14:19:37
Sample Name : tox462ml2
Sample ID : tox462ml2
Injection Volume : 1
Data File : C:\GCMSsolution\Data\pesticides\tox462ml2.qgd
Method File : C:\GCMSsolution\Data\pesticides\methodes_pesticides_Scan 220610bis.qgm
Tuning File : C:\GCMSsolution\System1\Tune1\Autotuning_EI_200C_10042013.qgr
Batch File :
Report File :
Comment :
Modified by : Admin
Modified : 20/05/2013 15:03:37

Chromatogram

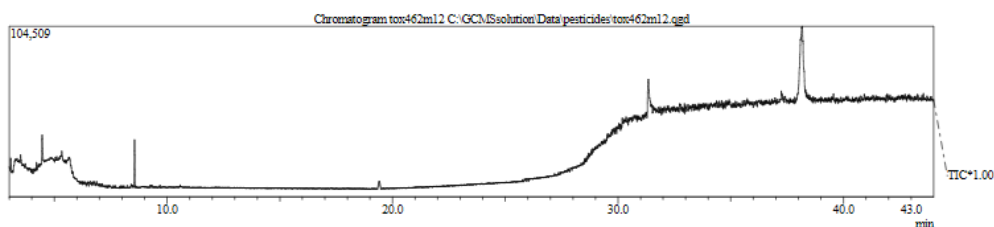


Figure 25 : chromatogramme échantillon 472



ROYAUME DU MAROC
MINISTÈRE DE LA SANTÉ
INSTITUT NATIONAL D'HYGIÈNE

20/05/2013 12:16:33

Rapport d'analyse GCMS

Sample Information

Analyzed by : Admin
Analyzed : 17/05/2013 11:07:17
Sample Name : tox439ml2
Sample ID : tox439ml2
Injection Volume : 1
Data File : C:\GCMSsolution\Data\pesticides\tox439ml2.qgd
Method File : C:\GCMSsolution\Data\pesticides\methodes_pesticides_Scan 220610bis.qgm
Tuning File : C:\GCMSsolution\System1\Tune1\Autotuning_EI_200C_10042013.qgr
Batch File :
Report File :
Comment :
Modified by : Admin
Modified : 17/05/2013 11:51:17

Chromatogram

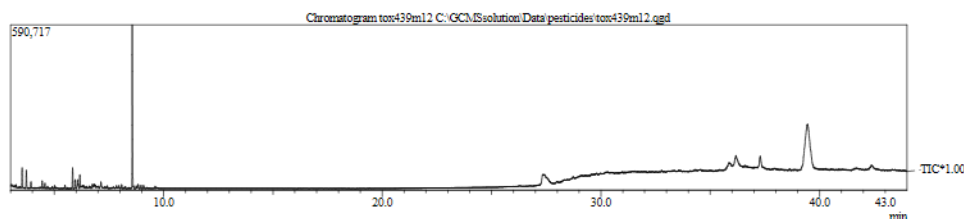


Figure 26 : chromatogramme échantillon 439



Bibliographie

- (1) Aldridge, A. N. Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl p-nitrophenyl thiophosphate and analogs (E605). *Biochem. J.* 46: 451-460 (1950).
- (2) Agenda annuel de l'AMIPHY (2002) : Association Marocaine de négociants, Importateurs et Formulateurs des produits Phytosanitaires. Imprimerie Kettani.
- (3) Abir KOUZAYHA, 2011. Développement des méthodes analytiques pour la détection et la quantification de traces des HAP et des pesticides dans l'eau. Application à l'évaluation de la qualité des eaux LIBANAISES. Thèse de Doctorat, UNIVERSITÉ BORDEAUX 1, France, 2011.
- (4) Assiya Ahmed Laaziz. ; Les intoxications médicolégales approches méthodologiques et analytique, Mémoire de fin d'étude, Université MOHAMMED V AGDAL, Faculté des Sciences, Maroc, 2012.
- (5) Mlle Hasna BENJRAD, thèse de pharmacie «Intoxication aigue et analyse toxicologique» N°24 Université Mohammed 5, Faculté de la médecine et de pharmacie, Rabat.
- (6) Carsel R.F., Smith C. N., 1987. Impact of pesticides on ground water contamination. In G.J. Marco et al (ed), *Silent spring revisited. American Chemical Society*, Washington, DC: 71-83.
- (7) Chernyak S.M., Rice C.P., McConnell L.L., 1996. Evidence of currently-used pesticides in air, ice, fog, seawater and surface microlayer in the Bering and Chukchi Seas. *Marine Pollution Bulletin* 32:410-419.
- (8) Couteux A., Lejeune V., 2006. Index Phytosanitaire ACTA 2006. 41eme édition, ACTA, Paris.
- (9) Cohen, J. A., and Oosterbaan, R. A. The active site of acetyl-cholinesterase and related esterases and its reactivity toward substrates and inhibitors. In: *Handbuch der Experimentellen Pharmakologie*, Vol. 15 (G. B. Koelle, Ed.), Springer-Verlag, Berlin, 1963, pp. 300-373.
- (10) Environmental protection agency (EPA) Fumigants aluminium phosphide, December 1997.
- (11) EL BAKOURI H. ; Développement de nouvelles techniques de détermination des pesticides et contribution à la réduction de leur impact sur les eaux par utilisation des substances organique naturelles (S.O.N). Thèse de Doctorat, Université ABDELMALEK ESSAADI, Faculté des sciences et techniques, Maroc, 2006.
- (12) E., Quintanilla-Vega B., 2004. Organophosphorous pesticide exposure alters sperm chromatin structure in Mexican agricultural workers. *Toxicology and Applied Pharmacology* 196:108-113.
- (13) GOSWAMI M, BINDAL M, SEN P fat and oil inhibit phosphine release from aluminium phosphide-its clinical implication. *Indian journal of experimental biology*, 1994.



- (14) Himel C.M., Loats H., Bailey G.W., 1990. Pesticide sources to the soil and principles of sprays physics. Pesticides in the soil environment: Processes, impacts and modeling SSSA Book series 2:7-50.
- (15) Hirashima, A.; Leader, H.; Holden, I.; Casida, J. E. J. Agric. Food Chem. 1984, 32, 1302-1307.
- (16) Karczmar, A. G., Usdin, E., and Wills, J. H. Anticholinesterase Agents. Pergamon Press, Oxford, 1970.
- (17) Khosla S. N, Handa R, Khosla P, aluminium phosphide poisoning. Trop .Doct.1992 ; 22(4) :155-7.
- (18) Main, A. R. Affinity and phosphorylation constants for the inhibition of esterases by organophosphates. Science 144:992-993 (1964).
- (19) Mme Nakib Lydia mémoire, présenté pour l'obtention du diplôme de magister en médecine vétérinaire thème «Mise au point d'une technique d'extraction des éléments traces métallique dans les produits de la mer et leurs dosage par spectrométrie d'absorption atomique».
- (20) Nshimiyimana François Xavier mémoire pour l'obtention du master en sciences «Méthode de dosage des pesticides dans le sang par chromatographie sur couche mince et chromatographie gazeuse couplé à une spectrométrie de masse ».
- (21) Rapport sur l'Etat de l'Environnement du Maroc (REEM), (2001): Synthèse. Observatoire National de l'Environnement du Maroc, Secrétariat d'Etat chargé de l'Environnement, Rabat.
- (22) Rosenberry, T. Acetylcholinesterase. In: Advances in Enzymology, Vol. 43 (A. Meister, Ed.), Interscience, New York, 1975, pp. 104-218.
- (23) Rekha, Naik S.N., Prasad R., 2006. Pesticide residue in organic and conventional food-risk analysis. Journal of Chemical Health and Safety 13(6):12-19.
- (24) Sanchez-Pena L.C., Reyes B.E., Lopez-Carillo L., Recio R., Moran-Martinez J., Cebrian M.
- (25) SINGH S, SINGH D, WIG N, and JIT I aluminium phosphide ingestion: a clinicopathologic study. J.toxicol.Clin.Toxicol, 1996, 34(5):703-706.
- (26) Thèse de pharmacie : Mlle Hasna BENJRAD, PHOSTOXIN : intoxication, aigue et analyse toxicologique, 1999, N° :24. Université Mohammed V faculté de médecine et de pharmacie Rabat.
- (27) UE (Union Européenne), 1991. Directive 91/414/CEE concernant la mise sur le marché de produits phytopharmaceutiques.
- (28) YADAV J. Need for antidote for aluminium phosphide poisoning. Indian J. Physiol. Pharmacol, 1997, 41(2):189-190.
- (29) www.crl-pesticides-datapool.eu



- (30) http://www.efsa.europa.eu/EFSA/ScientificOpinionPublicationReport/efsa_locale117862075_812_Conclusions.htm
- (31) www.observatoire-pesticides.gouv.fr
- (32) <http://www.culture.gouv.fr/culture/conservation/fr/methodes/atome.htm#Loi>
- (33) <http://webetab.ac-bordeaux.fr/Pedagogie/Physique/chromato.htm>
- (34) http://people.whitman.edu/~dunnivfm/C_MS_Ebook/CH2/2_3.html
- (35) <http://www.health.qld.gov.au/ph/documents/ehu/4174.pdf>
- (36) http://www.eau-seine-normandie.fr/fileadmin/mediatheque/Expert/Etudes_et_Syntheses/etude_2008/Guide_toxique/fiche_indiv/carbamates.pdf
- (37) <http://www.gci.ulaval.ca/professeurs/rgalvez/Extra%2063617/Laboratoire.pdf>
- ^a C. D. S. Tomlin, The e-Pesticide Manual, 2002, <http://www.bcp.org>, 12th Edition, Version 2.2, The British Crop Protection Council.
- ^b European Commission - SANCO E3, EU Pesticides Database (17.03.2009), 2008, http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm.
- ^c C. D. S. Tomlin, e-Pesticide Manual V5.0, 2009, 15th Edition, Version 5.0, The British Crop Protection Council, ISBN 978 1 901 396 19 5.
- ^d eMolecules, <http://www.emolecules.com/>.
- ^e ChemSpider, ChemSpider - Building Community for Chemists, 2007, <http://www.chemspider.com/>, Royal Society of Chemistry.
- ^f Terry R. Roberts, Metabolic Pathways of Agrochemicals - Part 2: Insecticides and Fungicides, 1999, The Royal Society of Chemistry.
- ^g EFSA – PRAPeR, Conclusions of Pesticide Risk Assessment Peer Review Unit (PRAPeR) on active substances which have undergone the peer review process at EU level.