

N° d'ordre : 3562

THESE

En vue de l'obtention du : **DOCTORAT**

Centre de Recherche : Eau, Ressources Naturelles, Environnement et Développement Durable (CERNE2D)

Structure de Recherche : Laboratoire Spectroscopie, Modélisation, Moléculaire, Matériaux, Nanomatériaux Eau et Environnement (LS3MN2E)

Discipline : Chimie-physique

Spécialité : Chimie Analytique et Environnement

Présentée et soutenue le 11/12/2021 par :

Bouchra BIRICH

Apport de la chromatographie (GC-MS et LC-MS/MS) dans le diagnostic des intoxications aiguës et chroniques par les pesticides au Maroc : Optimisation analytique et Etudes exploratoires

JURY

FAKHAOUI Mohammed	PES, Institut Scientifique, Université Mohammed V, Rabat	Président
TABYAOUI Mohamed	PES, Faculté des Sciences, Université Mohammed V, Rabat	Examineur/Rapporteur
SOULAYMANI Abdelmajid	PES, Faculté des sciences, Université Ibn Tofail, Kenitra	Examineur/Rapporteur
LAZAR Said	PES, Faculté des Sciences et Techniques, Mohammedia, Université Hassan II, Casablanca	Examineur/Rapporteur
BAMAAROUF Meryem	PH, Ecole Supérieure de Technologie de Salé, Université Mohammed V, Rabat	Examineur
BELLIMAM Moulay Ahmed	Institut de Criminalistique de la Gendarmerie Royale	Invité
BADRANE Narjis	Médecin toxicologue, Centre Antipoison et de pharmacovigilance du Maroc, Rabat	Co-Directeur de thèse
EL HAJJAJI Souad	PES, Faculté des Sciences, Université Mohammed V, Rabat	Directeur de thèse

Année Universitaire : 2020/2021

Dédicaces

Je dédie ce travail

A tous les combattants pour le savoir et la science,

A tous les militants pour des conditions de vie meilleure,

A ma mère et mon père, à qui je dois ma vie, ma persévérance,

A mon frère Mourad, mes sœurs Hanane, Maryem, Soukaina, mon neveu Chafik et ma nièce Dalia,

A mes amies de tous pays du monde

A ceux que j'aime

A tous ceux qui m'aiment

Remerciements

Avant tout, je dois remercier ALLAH le tout puissant qui m'a donné la force, le courage, la volonté pour mener à bout ce travail. Après plusieurs années laborieuses, cette thèse voit le jour. Il est redevable de remercier plusieurs personnes dont l'aide et le soutien ont orienté ce travail à son bon déroulement.

Les travaux présentés dans cette thèse ont été opérés au sein du Laboratoire de Spectroscopie, Modélisation Moléculaire, Matériaux, Nanomatériaux, Eau et Environnement (LS3MN2E) et le laboratoire du Centre Antipoison et de Pharmacovigilance du Maroc (CAPM) sous la direction du Professeur Souad EL HAJJAJI et du Docteur Narjis BADRANE.

Tout d'abord, mes remerciements vont à ma chère encadrante Professeur Souad EL HAJJAJI, responsable du centre de recherche de l'Eau, Ressources Naturelles, Environnement et Développement Durable, pour son temps, sa disponibilité et sa patience tout au long de la réalisation de cette thèse. Sa confiance accordée dans ces travaux m'a poussé à donner de mon mieux. Merci pour son aide qui m'a permis de progresser dans les meilleures conditions.

Je dois également remercier Docteur Narjis BADRANE, responsable du Laboratoire de toxicologie et de pharmacologie du CAPM, qui m'a activement Co-encadré durant ces années de thèse, je suis très reconnaissante pour ses encouragements, ces conseils et ses orientations pour mener à bien ce travail.

Je remercie également Professeur Mohammed FAKHAOUI, Directeur de l'Institut Scientifique de Rabat pour l'intérêt porté à ce travail et aussi d'avoir accepté de présider le jury.

Mr Mohamed TABYAOUI, Professeur d'Enseignement Supérieur à la Faculté des Science de Rabat, m'honore en acceptant d'être rapporteur et de participer au jury de thèse. Qu'il me soit permis d'exprimer mes vifs remerciements.

J'exprime à Mr Abdelmajid SOULAYMANI, Professeur d'Enseignement Supérieur à la Faculté des Sciences Kenitra, toute ma reconnaissance et je le remercie d'avoir accepté d'être rapporteur et examinateur de ce travail.

Je tiens à remercier aussi Mr Said LAZAR, Professeur d'Enseignement Supérieur à la Faculté des Sciences et Techniques Rabat, d'avoir accepté d'être membre du jury et d'examiner mon travail de thèse.

Mes remerciements s'adressent aussi à Mme Meryem BAMAAROUF, Professeur Habilité à l'Ecole Supérieure de Technologie de Salé, pour avoir accepté d'examiner ce travail et d'être membre de jury de cette thèse.

Mes remerciements vont également à notre invité Mr Moulay Ahmed BELLIMAM de l'Institut de Criminalistique de la Gendarmerie Royale pour avoir été membre de ce jury.

Que mes remerciements soient désignés aussi à Mme Rachida BENCHEIKH SOULAYMANI, Directeur du CAPM pour son accueil au sein de son établissement à fin de réaliser ce travail de thèse.

Je n'oublie pas de remercier Mr Mohamed GHANDI, responsable approvisionnement et maintenance au laboratoire de toxicologie du CAPM, pour son aide et pour l'aisance que dégageait le travail à ses côtés. Je remercie aussi Mme Naima AIT DAOUD responsable du pôle GC-MS au laboratoire pour son partage et son aide précieux lors du déroulement de ces travaux.

Ce travail ne serait mené à bien sans l'aide et l'appui du personnel du laboratoire du CAPM. Je les remercie vivement pour leur collaboration et leur aide précieuse. Merci Asmae, Mostapha, Oumaima, Fatima, Naima, Hasna, et Mouna.

Je dois particulièrement remercier les bureaux municipaux d'hygiène de Rabat, Kenitra, Temara et Skhirat-Sebbah, pour l'acceptation de la réalisation de notre étude, je remercie les médecins, les infirmiers et tout le personnel. Sans oublier évidemment tous les participants dans l'enquête d'évaluation.

Je remercie de même tous les agriculteurs bénévoles qui nous ont fait confiance et pour leur engagement positif dans ces travaux. Je remercie également Abdelkarim, gérant de culture agricole, pour son aide dans l'étude d'évaluation.

Je remercie toutes personnes ayant aidé de près ou de loin pour que ce travail voit le jour.

J'exprime mes remerciements à mes respectueux professeurs au sein du Laboratoire de Spectroscopie, Modélisation Moléculaire, Matériaux, Nanomatériaux, Eau et Environnement (LS3MN2E) qui ont assuré notre formation théorique et pratique ainsi que tous les collègues, doctorants et personnel de la Faculté des Sciences de Rabat.

Résumé

Les intoxications par les pesticides représentent toujours un intérêt pour la santé publique dans le monde entier et particulièrement dans les pays en développement. L'objectif est de montrer l'apport des analyses chromatographiques dans les intoxications aiguës et chroniques par les pesticides chez la population marocaine. Deux travaux d'optimisation et de validation analytique de méthode de détection de pesticides ont été élaborés. De plus, deux études rétrospectives exploratoires ont été réalisées pour évaluer l'exposition aux pesticides chez des professionnels (agents d'hygiène et agriculteurs) et chez la population marocaine. Ceci par questionnaire et par le biomonitoring en utilisant la mesure de l'activité cholinestérasique et l'analyse chromatographique par GC-MS et LC-MS/MS. Il s'agit de 453 analyses réalisées. Une détection de 19 pesticides par GC-MS et LC-MS/MS. Pour les intoxications aiguës, 50 % des cas sont des enfants âgés de 1 jour à 14 ans. Alors que chez les agents d'hygiène, 28% sont analphabètes et 62% utilisent au moins un seul moyen de protection contre les pesticides lors de la manipulation. Ils affirment que la durée de contact avec ces molécules varient entre 1 an et 36 ans. Pour les agriculteurs, 14% des participants ont été déjà hospitalisés à cause d'une intoxication par les pesticides. Ce travail contribue à mettre une alerte toxicologique dans le contexte des intoxications aiguës et chroniques aux pesticides. Une surveillance et sensibilisation régulières sont fortement recommandées chez la population marocaine pour savoir les bonnes pratiques d'utilisation de ces produits et prévenir les intoxications humaines. Une réglementation de rigueur doit également prendre place pour mieux réguler le marché parallèle des pesticides au Maroc.

Mots clés : Pesticides, intoxication aiguë, exposition professionnelle, activité cholinestérasique, GC-MS, LC-MS/MS.

Abstract

Pesticide poisoning continues to concern public health around the world and particularly in developing countries. The objective is to show the contribution of chromatographic analyzes in acute and chronic poisoning by pesticides among Moroccan population. Optimization and analytical validation of the pesticide detection method were developed. In addition, two retrospective studies were carried out to assess exposure to pesticides among professionals (hygiene officers and farmers) and among the Moroccan population, by using questionnaire and by bio-monitoring with cholinesterase activity measurement and chromatographic analysis by GC-MS and LC-MS/MS. It is 453 analyzes performed with a detection of 19 pesticides by GC-MS and LC-MS/MS. For acute poisoning, 50% of cases are children aged from 1 day to 14 years. Among hygiene officers, 28% are illiterate and 62% use at least one means of protection against pesticides when handling. They claim that the duration of contact with these molecules varies between 1 year and 36 years. For farmers, 14% of participants have already been hospitalized due to pesticide poisoning. This work helps to put a toxicological alert in the context of acute and chronic pesticide poisoning. Regular surveillance and awareness-raising are strongly recommended among the Moroccan population to learn about good practices for the use of these products and to prevent human poisoning. Strict regulations must also take place to regulate the parallel pesticide market in Morocco.

Key Words: Pesticides, acute poisoning, occupational exposure, cholinesterase activity, GC-MS, LC-MS/MS

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les marqueurs d'exposition aux organochlorés dans le sang et les urines.....	7
Tableau 2 : Les groupes des organophosphorés selon le type du substituant en Y	10
Tableau 3 : Métabolites spécifiques des organophosphorés.....	11
Tableau 4: Les métabolites des carbamates.....	14
Tableau 5: Les métabolites urinaires de pyréthrinoïdes de synthèse et le composé parent correspondant ...	15
Tableau 6: La quantité d'information générée par les différentes techniques.....	32
Tableau 7: Les paramètres à étudier selon le type d'analyse	47
Tableau 8: Les TR et MRM et énergies trouvées par optimisation.....	55
Tableau 9 : Gammes des concentrations en ppb des pesticides utilisées pour la quantification	57
Tableau 10: Les R ² des courbes de linéarité des pesticides.....	58
Tableau 11: Les concentrations calculées pour les standards de calibration et l'erreur relative ER.....	65
Tableau 12: Analyse statistiques de l'AChE et l'BChE par deux méthodes mesurées dans le sang	75
Tableau 13: Caractéristiques des cas positifs d'intoxications aiguës par les pesticides.....	78
Tableau 14: Résultats de l'activité cholinestérasique (AChE et BChE)	89
Tableau 15: Caractères sociales et démographiques des agents d'hygiène (N = 54).	92
Tableau 16: Résultats des BChE et AChE	97
Tableau 17: Résultats statistique des BChE et AChE	99

Liste des figures

Figure 1: Structure chimique générale des organophosphorés (ChemDraw Professionnel 16.0	10
Figure 2 : La structure générale des carbamates (ChemDraw Professionnel 16.0).....	12
Figure 3: Utilisation des pesticides en fonction de la superficie des cultures au Maroc	16
Figure 4: Répartition des intoxications aiguës par les pesticides en fonction des années, CAPM.....	23
Figure 5: Représentation schématique de la route d'un toxique depuis l'exposition vers l'effet sur la santé	26
Figure 6: Représentation de la terminologie en relation avec l'identification	31
Figure 7: Un spectre de masse typique.....	33
Figure 8 : Processus du criblage toxicologique.....	33
Figure 9: Schéma du processus analytique subi par l'échantillon.....	35
Figure 10 :Chromatogramme du blanc (méthanol)	56
Figure 11 : Chromatogrammes du total des MRMs (a) et du TIC des MRMs (b) du mélange du standard des pesticides dans le solvant.	56
Figure 12 : Les MRMs et le spectre de masse du Diméthoate, à partir du chromatogramme du mélange ...	57
Figure 13 : Courbes de linéarité des 15 pesticides	59
Figure 14: Structure chimique du diazinon	61
Figure 15: Chromatogrammes de différentes concentrations des standards de calibration.....	64
Figure 16: Dissociation du diazinon (O,O-diethyl phosphonothioate; m/z et 2-isopropyl-6-methylpyrimidin-4-ol).	64
Figure 17: La courbe de calibration linéaire du diazinon.....	65
Figure 18: Répartition des demandes d'analyse des pesticides selon les tranches d'âge	73
Figure 19: Distribution des patients selon le genre	73
Figure 20: Répartition des cas d'intoxication par les pesticides selon les villes de provenance	74
Figure 21: Répartition des cas reçus d'intoxication aiguës par les pesticides selon les années	74
Figure 22: Corrélation entre l'AChE, la BChE et l'âge pour la première méthode.....	76
Figure 23: Corrélation entre l'AChE et la BChE première méthode.....	76
Figure 24: Corrélation de l'AChE, la BChE avec l'âge pour la deuxième méthode.....	76
Figure 25: Corrélation entre la BChE et l'AChE pour la deuxième méthode.....	77
Figure 26: Familles des pesticides impliquées dans les cas d'intoxications aiguës par les pesticides.....	78
Figure 27: Détection de l'alpha-chloralose par la GC-MS.....	80
Figure 28: Détection de l'alpha-chloralose par la LC-MS/MS	81
Figure 29: La répartition des valeurs de l'AChE.....	88
Figure 30: La répartition des valeurs de la BChE	88

Figure 31: Répartition par pourcentage des actions préventives chez les travailleurs après exposition aux pesticides	93
Figure 32: Courbes de corrélation de l'AChE et BChE et l'indice de masse corporelle.....	93
Figure 33: Courbes de corrélation de l'AChE et BChE et l'âge.	94
Figure 34: Le signal TIC du prélèvement par la LC-MS/MS (A). B et C les spectres de masse du signal à 4.62 min.....	94
Figure 35: La correspondance du spectre de masse à la base de données de la LC-MS/MS	95
Figure 36: Chromatogramme du prélèvement du premier agent par GC-MS.....	95
Figure 37: Courbes de corrélation de l'AChE et BChE et l'âge.	99
Figure 38: Courbes de corrélation de l'AChE et BChE et la durée de contact.	99

Liste des abréviations

AChE	Acétylcholinestérase
BChE	Butyrylcholinestérase
BMH	Bureau municipal d'hygiène
CAPM	Centre antipoison et de pharmacovigilance du Maroc
Cbt	Carbamates
CE	Energie de collision
CEP	Potentiel d'entrée dans la cellule de collision
CXP	Potentiel de sortie de la cellule de collision
DP	Potentiel de «déclusterisation»
EP	Potentiel d'entrée
ESI	Ionisation par electrospray
GC-MS	Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
LC-MS/MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LLE	Extraction liquide liquide
LOD	Limite de détection
LOQ	Limite de quantification
MRM	Multiple Reaction Monitoring
OC	Organochloré
OMS	Organisation mondiale de la santé
OP	Organophosphoré
QUESHERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe
RSK	Rabat- Salé- Kenitra
SIM	Single Ion Monitoring
SMPE	Micro extraction sur phase solide
SPE	Extraction sur phase solide
TIC	Total ion chromatogramme
TR	Temps de rétention

Table de matière

Introduction	1
Partie 1 : Partie bibliographique.....	4
Chapitre 1 : Généralités sur les pesticides.....	5
1 Classification des pesticides	5
1.1 Définitions	5
1.2 Classification	5
1.3 Les insecticides.....	6
1.3.1 Les organochlorés OCs	6
1.3.2 Les organophosphorés.....	9
1.3.3 Les carbamates	12
1.3.4 Les pyréthroides	14
2 Les pesticides au maroc	16
2.1 Consommation des pesticides au Maroc	16
2.2 Législation des pesticides au Maroc.....	16
2.3 Les pesticides dans la santé publique et hygiène.....	17
Chapitre 2 : Exposition aux pesticides chez l'être humain	19
1 Intoxications aiguës causées par les pesticides.....	19
1.1 Les intoxications aiguës par les pesticides à l'échelle internationale.....	20
1.2 Les intoxications par les pesticides en Afrique	21
1.3 Les intoxications aiguës par les pesticides au Maroc	22
1.4 Les intoxications par les pesticides chez les enfants	24
2 Exposition professionnelle aux pesticides et intoxications chroniques	24
2.1 Surveillance biologique – Biomonitoring.....	25
2.1.1 Mesure de l'activité cholinestérasique	27
2.2 Etudes d'exposition chronique aux pesticides.....	27
2.3 L'utilisation des moyens de protection contre les pesticides	28
Chapitre 3 : Apport des analyses toxicologiques dans les intoxications aux pesticides chez l'humain	31
1 Aperçu général.....	31
1.1 L'identification et le criblage toxicologique	31
1.1.1 Identification toxicologique	31
1.1.2 Criblage toxicologique ou Screening	33

2	Etapes analytiques des methodes d'identification des pesticides dans les matrices biologiques	35
2.1	Préanalytique: avant l'analyse instrumentale	35
2.1.1	Méthode d'extraction	36
2.1.1.1	Extracton liquide-liquide	36
2.1.1.2	Extraction sur phase solide	37
2.2	Analytique	39
2.2.1	Méthodes d'analyse	39
2.2.1.1	La chromatographie	40
2.2.1.2	Spectromètre de masse	41
2.2.1.2.1	La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)	42
2.2.1.2.2	La chromatographie en phase liquide	44
2.3	Post-analytique	45
	Chapitre 4 : Validation et optimisation des méthodes d'analyse	46
1	Les methodes d'analyse pour la validation	46
1.1	Les analyses de type quantitatif	47
1.2	Les analyses de type qualitatif	47
1.3	Les analyses assimilables à des analyses quantitatives	47
2	Elements principaux d'une validation	48
2.1	Fidélité	48
2.1.1	Répétabilité	48
2.1.2	Fidélité intermédiaire	49
2.2	Reproductibilité	49
2.3	Justesse (biais)	49
2.4	Limite de détection et limite de quantification	50
2.4.1	Limite de détection	50
2.4.2	Limite de quantification	50
2.5	Linéarité	51
2.6	Stabilité	51
	Partie 2 : Optimisation et validation analytique de méthode d'identification de pesticides dans le plasma humain	52
	Chapitre 1 : Optimisation de la detection de 15 molecules de pesticides par la LC-MS/MS	53
1	Méthodes et matériels	53
1.1	Méthode	53

1.2	Matériels	53
1.2.1	Standard des pesticides.....	53
1.2.2	Solvants	54
1.2.3	Appareillages.....	54
1.2.4	LC-MS/MS.....	Erreur ! Signet non défini.
1.2.5	Extraction	54
2	Résultats.....	55
2.1	Optimisation	55
2.2	Détection.....	55
2.3	Quantification	57
3	Discussion.....	60
Chapitre 2 : Méthode sélective de quantification du diazinon dans le plasma humain par GC-MS		61
1	Matériels et méthodes	61
1.1	Solvants	62
1.2	Instrumentations	62
1.3	Calibration	62
1.4	Préparation de l'échantillon.....	62
1.5	Analyse par la GC/MS.....	63
2	Resultas	Erreur ! Signet non défini.
2.1	Determination par la chromatogrpahie gazeuse	63
2.2	Methode de validation	64
2.2.1	Linearité de la courbe de calibration.....	64
2.2.2	Limite de détection (LOD) et Limite de quantification (LOQ)	65
2.2.3	Exactitude et précision	66
3	Discussion.....	66
Partie 3 : Apport de la chromatographie dans les intoxications aiguës et l'exposition professionnelle		68
Chapitre 1 : Apport des analyses toxicologiques sur les intoxications aiguës par les pesticides chez la population marocaine		69
1	Méthodes et materiels	69
1.1	Traitement des prélèvements au laboratoire.....	69
1.2	Dosage de l'activité cholinestérasique	70
1.2.1	Méthode 1: Test-mate ChE Cholinesterase Test System (Model 400).....	70
1.2.2	Méthode 2 : ChE check mobile.....	71
1.3	Techniques chromatographiques	71

1.3.1	GC-MS	71
1.3.2	LC-MS/MS.....	Erreur ! Signet non défini.
1.3.3	Solvants	72
1.3.4	Extraction	72
2	Résultats.....	72
2.1	Caractéristiques démographiques	72
2.2	Mesure de l'activité cholinestérasique	74
2.3	L'analyse chromatographique	77
3	Discussion.....	Erreur ! Signet non défini.
Chapitre 2 : Exposition professionnelle aux pesticides chez les agents d'hygiène du BMH et chez les agriculteurs..... 84		
1	Exposition professionnelle aux pesticides chez les agents d'hygiène du BMH	84
1.1	Les missions des Bureaux municipaux d'Hygiène (BMH).....	84
1.2	La région Raba-Salé-Kenitra (RSK).....	85
1.3	L'étude exploratoire	85
1.3.1	Description de la population à l'étude.....	86
1.3.2	Recrutement des agents consentants	86
1.3.3	Méthode de prélèvement et conservation.....	87
1.3.4	Mesure de l'activité cholinestérasique	87
1.3.5	Analyse chromatographique.....	87
1.3.6	Analyse des données	87
1.4	Résultats.....	88
2	Exposition professionnelle aux pesticides chez les agriculteurs marocains	95
2.1	Méthodes	95
2.1.1	Recrutement des agriculteurs	96
2.1.2	Questionnaire	96
2.1.3	Prélèvement.....	96
2.1.4	Activité cholinestérasique et analyse chromatographique	96
2.2	Résultats.....	96
2.3	Discussion.....	100
Conclusion..... 104		
Références		
		Erreur ! Signet non défini.
Liste des publications et communications..... 122		
Annexes..... 126		

Introduction

Les pesticides sont des produits chimiques répartis dans le monde entier. Ils sont massivement utilisés pour l'agriculture, pour protéger les plantes des nuisibles et aussi pour la santé publique. En effet en 2008, le marché mondial des pesticides cumulait environ 40 milliards de dollars dont la part de l'Afrique est estimée à 4% (soit 1,5 milliard de dollars). Au Maroc, il s'agit d'une importation de 17134 tonnes de pesticides pour une somme de 799 millions de Dirhams. Pourtant, 30% des pesticides vendus dans les pays en développement ne sont pas conformes aux normes mondiales, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) [1]. Néanmoins, selon la même organisation (OMS), les pesticides présentent toujours une menace pour toutes les populations. Ils sont sources de danger et responsables de plusieurs cas d'intoxications mortelles, qui atteignent 5 millions de cas par an [2]. Les pays en développement sont les plus exposés à ces menaces car ils enregistrent des nombres importants d'intoxications. D'ailleurs, au Sri Lanka, 50 % des intoxications nationales sont causées par les pesticides [3], dont 60% sont des cas de suicide. Selon le Centre Antipoison et de Pharmacovigilance du Maroc (CAPM), 11 196 cas d'intoxications par les pesticides ont été recensés entre 2008 et 2016 [4]. Il s'agit de 10,7% de l'ensemble des cas collectés. Par ailleurs, l'exposition chronique aux pesticides peut causer des effets néfastes sur la santé. Ces produits peuvent donner des effets cancérogènes, ou sur le système nerveux, des effets sur la reproductivité et même un effet sur le système immunitaire [5–9]. Dans ce contexte, une étude a montré que l'exposition du père aux organophosphorés peut causer des fausses couches et de la prématurité dans la famille [10].

Les grandes masses de produits consommés, englobe une partie importante de mésusage, soit par une application excessive en traitement ou bien par manque de protection ou d'actions préventives chez les personnes en contact régulier avec ces molécules. En effet, il existe une grande population exposée à ces molécules soit, les agriculteurs, les travailleurs en santé publique en contact avec les pesticides ou les manipulateurs des produits synthétisés dans les usines de fabrication mais aussi une population qui vit à proximité de ces lieux d'usage et aussi la population générale[11–14].

La surveillance biologique ou le « Biomonitoring » Humain (BH) est un outil efficace pour la vigilance, le suivi et le diagnostic sanitaire de l'exposition aux pesticides [15]. L'activité cholinestérasique est le biomarqueur universel le plus utilisé pour cette finalité [16]. Elle est utilisée particulièrement pour le suivi des intoxications par les organophosphorés (OP) et les carbamates (CM) en tant qu'inhibiteur de la cholinestérase [17, 18], en se référant aux travaux

d'Ellman [19]. Le bio-monitoring s'appuie également sur les analyses toxicologiques sur les matrices biologiques par des méthodes et techniques d'identification comme les techniques chromatographiques, afin de trouver la molécule ou les molécules responsables de l'intoxication aiguë ou chronique [20–23]. Il est donc important de développer et/ou valider des méthodes de détermination des pesticides dans les matrices biologiques humaines. L'utilisation des techniques chromatographiques, surtout les méthodes utilisant le couplage avec la spectrométrie de masse, permettent de déterminer un nombre considérable des pesticides dans les urines et le sang avec une grande sensibilité [24]. Cette détermination est conditionnée par une étape de traitement de la matrice afin de purifier et simplifier la composition de l'échantillon avant l'analyse instrumentale. L'extraction liquide-liquide (LLE) est la première méthode utilisée dans ce sens. Il existe d'autres moyens à savoir, l'extraction de phase solide (SPE) et la microextraction en phase solide (SMPE) qui permettent de diminuer les émulsions observées dans la LLE. De plus, des dérivatisations sont choisies dans le cas des analyses difficiles pour la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

Au Maroc, les données sur les intoxications aiguës par les pesticides sont enregistrées au niveau de la base de données nationale du CAPM. En revanche, les données nationales des expositions chroniques manquent considérablement, vu la difficulté de diagnostic et de l'établissement du lieu de causalité entre l'exposition et l'état pathologique de l'exposé. En plus, peu d'études marocaines se sont intéressées à l'évaluation de l'exposition humaine en contact régulier avec les pesticides, dans des matrices biologiques. Il existe une étude sur l'exposition aux insecticides, par la mesure de l'activité cholinestérasique, en milieu rural chez les agriculteurs à Settat faite en 2006 [25]. De plus, une autre investigation s'est intéressée en 2016, au dosage des résidus des pesticides chez des patients du service d'endocrinologie du CHU de Rabat par chromatographie [26]. Ces études manquent également chez une population particulière, représentée par les travailleurs des bureaux communaux d'hygiène (BCH). Une seule étude a été faite en 2016 sur l'exposition aux organophosphorés chez les agents d'hygiène du BCH de Fès [27].

Dans ce contexte, ce travail, étant le premier de son genre au Maroc, à notre connaissance, s'intéresse à montrer l'intérêt des analyses toxicologiques par chromatographie (GC-MS et LC-MS/MS) dans les cas d'exposition aiguë chez la population et chronique en milieu professionnel par les pesticides à travers deux études prospectives :

- Etude visant les intoxications aiguës chez la population marocaine, à partir des cas reçus au laboratoire du CAPM.

- Etude visant l'exposition professionnelle aux pesticides, chez les agents d'hygiène des bureaux municipaux d'hygiène (BMH) de la région de Rabat-Salé- Kenitra (RSK) et les agriculteurs marocains.

De plus, une optimisation analytique de détection et dosage des pesticides a été élaborée en utilisant la GC-MC et LC-MS/MS par extraction liquide-liquide et par extraction avec QUECHERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe).

De ce fait, il a été nécessaire de faire une synthèse bibliographique, présentée dans la première partie, en mettant l'accent sur des généralités sur les pesticides, des données sur les intoxications aiguës et l'exposition professionnelle aux pesticides ainsi que les techniques de séparation et les méthodes d'extraction utilisées dans ce domaine d'étude.

La deuxième partie quant à elle, présente deux travaux d'optimisation et de validation de deux méthodes d'analyse de pesticides par la GC-MS et LC-MS/MS. Ainsi que deux études, d'évaluation d'expositions aiguës et chroniques aux pesticides chez des professionnels et la population générale. Les résultats et la discussion sont dressés à la fin de chaque partie

En fin du rapport, on dresse une conclusion sur les travaux ainsi que les limites et les perspectives pour des recherches ultérieures.

Partie 1 : Partie bibliographique

Chapitre 1 : Généralités sur les pesticides

1 Classification des pesticides

Le dichloro-diphényl-richlorethane (DDT) était le premier pesticide synthétisé dans le 19^{ème} siècle. En effet, cette molécule fait partie de la première génération des pesticides ; les organochlorés (OC)s. Ils sont très toxiques et persistent dans l'environnement. La deuxième génération comporte les organophosphorés (OP)s. Contrairement aux OCs, les OPs ne sont pas persistants dans l'environnement mais ils sont toujours aussi toxiques. La troisième génération, quant à elle, se compose des pyrèthroides qui sont apparus pour la première fois entre 1970 et 1980 à partir des pyrèthres naturels. Ils sont moins toxiques pour l'homme mais plus efficaces sur la cible et peu persistants dans l'environnement.

1.1 Définitions

Plusieurs définitions sont proposées pour les pesticides [28], [29]. Toutes en accord que, ce sont des substances, d'origine biologique ou chimique, utilisées soit dans l'agriculture pour contrôler ou éliminer tout vecteur de maladie pendant la production ou le stockage des aliments d'origine agricole, soit pour la santé publique et/ou à usage domestique afin de détruire toutes pestes indésirables et qui menacent la santé des animaux et des humains. Ces substances ont un effet grave au principe actif qui exerce une action générale ou spécifique sur les organismes nocifs. Une confusion peut paraître entre les notions de « biocides » et des « produits phytosanitaires ». Ces derniers sont utilisés particulièrement pour l'agriculture alors que les biocides ne le sont pas.

1.2 Classification

La classification des pesticides peut prendre deux sens principaux, selon la nature de la substance ou bien selon la nature chimique.

- **Selon la nature de la substance**

On distingue plusieurs familles pour ce type de classification, mais de manière générale trois familles sont les plus dominantes ; les herbicides, les fongicides et les insecticides.

Les herbicides : d'après leur nom, ces produits sont destinés à éliminer ou à contrôler les herbes qui ralentissent ou stoppent la croissance des plantes. Ils sont considérés comme étant les plus utilisés dans l'agriculture.

Les fongicides : ils sont principalement utilisés contre les champignons et les moisissures en agriculture.

Les insecticides : ce sont les produits utilisés contre les insectes, soit en agriculture, en santé publique, sur les animaux ou dans les locaux.

- **Selon la nature chimique de la substance active**

Cette classification est d'autant mieux utilisée pour la chimie analytique. Il s'agit de distinguer les propriétés physico-chimiques des pesticides. Les principaux groupes en question sont : les organochlorés (OCs), les organophosphorés (OPs), les carbamates (CBTs), les pyréthrinés (PTs) etc. Pourtant, selon cette classification, des pesticides peuvent être classés dans plusieurs familles et peuvent avoir plusieurs groupements spécifiques dans leur composition.

1.3 Les insecticides

1.3.1 Les organochlorés OCs

Les Pesticides Organochlorés (OCs) sont des composés organiques, obtenus par la chloration de différents hydrocarbures insaturés [30]. Ils se caractérisent par une faible solubilité dans l'eau, mais une solubilité élevée dans les solvants organiques, très résistants à la dégradation biologique, chimique et photolytique. Ces pesticides sont utilisés pour améliorer la productivité et/ou pour faire baisser les coûts de production de différents secteurs économiques dans le monde entier. Leur demi-vie environnementale va de quelques mois à plus de 20 à 30 ans [31]. Par exemple pour le chlordane, la durée de demi-vie est de 1 à 20 ans.

Initialement reconnue comme un avantage car permettant des applications réduites et/ou espacées, la rémanence des OCs s'avère rapidement un sérieux inconvénient pour l'environnement par destruction d'espèces non visées, perturbation prolongée des écosystèmes, accumulation dans les graisses des organismes vivants et concentration le long de la chaîne alimentaire. Les OCs peuvent également s'accumuler dans le tissu adipeux (foie) d'où ils sont éliminés de façon graduelle lorsque l'exposition cesse.

Il existe plusieurs OCs, on peut les compter au nombre d'une vingtaine ; tel que Aldrine, Dieldrine, Endrine, Chlordane et ses isomère, Heptachlore, Lindane et ses isomères, HCB, Endosulfane, Mirex, Dichlorodiphényl éthane (DDE), Dichlorodiphényldiétahne (DDD), Dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), ...etc.

A cause de leurs rémanences, le suivi biologique des OCs est fait par le biais de l'analyse des produits parents et de leurs métabolites. Les concentrations de ces composés dans les milieux

biologiques, peuvent donc être le reflet d'une exposition récente ou chronique avec accumulation, ou la somme de ces deux voies d'exposition. En outre, ces composés très lipophiles sont des perturbateurs endocriniens et en ce sens, sont toujours étudiés aujourd'hui pour le cas des malformations congénitales ou encore dans la recherche des causes de l'accroissement des cancers du sein. Les OCs et leurs marqueurs d'exposition à rechercher sont très diversifiés selon la molécule mère. Une illustration des exemples est dressée dans le tableau 1 [32].

Tableau 1 : Les marqueurs d'exposition aux organochlorés dans le sang et les urines

Les OCs	Marqueurs dans le sang	Marqueurs dans les urines
Hexachlorobenzène	Hexachlorobenzène	Pentachlorophénol 2,4,6-Trichlorophénol 2,4,5-Trichlorophénol
Hexachlorocyclohexanes	Hexachlorocyclohexane incluant les isomères β et γ (lindane)	Pentachlorophénol 2,4,6-Trichlorophénol 2,4,5-Trichlorophénol
Pentachlorophénol		Pentachlorophénol
Trichlorophénols (incluant 2,4,6-Trichlorophénol et 2,4,5-Trichlorophénol)		2,4,6-Trichlorophénol 2,4,5-Trichlorophénol
DDT (p,p'-DDT et o,p'- DDT)	p,p'-DDE	
Heptachlore	Heptachlore epoxyde	
Chlordane	Oxychlordane	
Aldrine	Aldrine Dieldrine	
Dieldrine	Dieldrine	
Endrine	Endrine	
Mirex	Mirex	
Chlordécone	Chlordécone	
Dicofol	Dicofol	acide 4,4'- dichlorobenzilique acide 4,4'- dichlorodiphénylacétique

Endosulfan	Endosulfan (α et β)	Endosulfan (α et β)
	Endosulfan éther	Endosulfan éther
	Endosulfan lactone	Endosulfan lactone
	Endosulfan diol	Endosulfan sulfate
	Endosulfan sulfate	

L'élimination des OCs se fait généralement via le système urinaire et reproducteur. Le lait maternel est aussi une voie principale chez les femmes [33].

Plusieurs OCs ont été confirmés toxiques. Cette toxicité est généralement accompagnée par des symptômes que cela soit dans le cas des intoxications aiguës ou bien chroniques.

- Des vomissements et diarrhées (HCH), nausées (Aldrine/dieldrine/endrine)
- Des effets chroniques sur le système nerveux (Aldrine/dieldrine/endrine, DDT/DDD/DDE) entraînant des maux de tête, des nausées, des vomissements, l'irritabilité, voire des convulsions. L'ingestion de nourriture contaminée par l'endrine peut provoquer des nausées et des vomissements. Aucune étude n'a été trouvée concernant d'autres effets systémiques chroniques chez l'homme [33].
- La photosensibilité (HCB) (lésions cutanées, développement anormal de la pilosité) [33].

L'exposition professionnelle peut provoquer des problèmes dermatologiques ou allergiques, des paralysies de la face et des extrémités, des vomissements, des pertes de sommeil, des avortements ou des accouchements prématurés, voire des atteintes neurologiques [33].

Les OCs peuvent se propager dans l'environnement contaminant différentes matrices. La pollution peut être liée à la production, au stockage des produits chimiques concernés, à leur application et au processus de transport naturel des polluants. L'étude du devenir des OCs est très importante, car cela permet d'effectuer des estimations de risques à long terme liés à l'accumulation de ces polluants dans l'environnement pour ce qui concerne la qualité des produits alimentaires. La présence des OCs dans l'air est due aux émissions des entreprises chimiques de production de pesticides, traitement des cultures agricoles et des plantations d'arbres. Les plus grandes concentrations de pesticides passent dans l'atmosphère après les épandages aériens.

Les OCs avec leurs métabolites ont été détectés dans les aliments partout dans le monde. La détermination des OCs dans divers milieux, tels les aliments, a connu le jour après les années 1960 [34].

Les différentes recherches sur produits alimentaires (lait, fromages, beurres, les oeufs, viande), ont montré que le p,p'-DDE, le β -HCH et le lindane sont les résidus les plus fréquemment mesurés et à des taux plus importants que les autres insecticides [35].

En 1970 beaucoup de pays ont décidé d'interdire l'utilisation du HCH-technique et d'autres pesticides organochlorés vu leur rémanence et leur toxicité. Les Etats Unis et le Canada ont interdit l'usage de ces produits et mélanges respectivement en 1971 et 1978. Malgré l'interdiction, la Chine, l'Inde et l'Union Soviétique sont restées les plus grands producteurs et utilisateurs de ces produits jusqu'aux années 80-90. La Chine abandonna le HCH et le lindane en 1983 et l'Union Soviétique en 1990, mais ces pays ont permis d'utiliser les stocks existants.

En septembre 2006, l'OMS a recommandé l'utilisation du DDT pour contrôler le malaria. Cet insecticide est plus puissant que les autres nouvelles formulations. Pour appliquer cette décision il faut bien surveiller les effets négatifs sur la santé humaine, et aussi il faut s'assurer que le DDT ne contamine pas les cultures agricoles.

1.3.2 Les organophosphorés

Les capacités neurotoxiques des OPs furent découvertes d'abord chez l'Homme par le Dr. Schrader, quelques années avant la guerre 40-45, lors de l'élaboration de gaz de combat neurotoxiques comme le sarin, le soman et le tabun . Ce n'est que quelques années plus tard que leur action insecticide fut mise en évidence. Des lors, de nombreux OPs ont été synthétisés. Leurs propriétés physico-chimiques ont été modifiées afin d'améliorer leur activité insecticide mais également de manière à réduire leur stabilité dans l'environnement. Leur forte capacité insecticide associée à une toxicité aigüe considérée modérée chez les mammifères et une stabilité relativement faible dans l'environnement (par rapport aux organochlorés) ont fait des OPs la principale classe d'insecticides utilisés dans le monde, et encore actuellement.

Leur principe actif repose sur la perturbation du fonctionnement du système nerveux par l'inhibition d'une enzyme essentielle à son bon fonctionnement : l'acétylcholinestérase. (AChE). Cette enzyme est commune à de nombreux représentants du règne animal, ce qui ne confère aux OPs qu'une relative sélectivité. C'est la raison pour laquelle leur activité ne se limite pas aux insectes. Par exemple, les OPs sont très dangereux pour les écosystèmes aquatiques (invertébrés et poissons), même à de très faibles doses [36].

Tous les OPs ont la même structure de base. Il s'agit d'ester d'alcools avec l'acide ortho phosphorique ou avec l'acide thiophosphorique[36].

On peut schématiser leur structure chimique comme montrer dans la figure suivante (figue1) : Lorsque la double liaison avec le phosphore se fait avec un soufre, on parle d'organothiophosphates. Le groupe R est en général un groupe éthyle ou méthyle. On peut subdiviser les OPs en trois groupes, en fonction du type de substituant en Y (Tableau1).

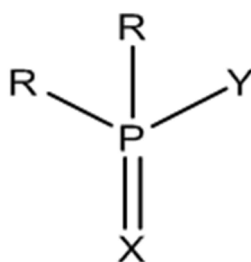


Figure 1: Structure chimique générale des organophosphorés

R : chaîne carbonée + O, Y : O ou S, X : divers substituants

Tableau 2 : Les groupes des organophosphorés selon le type du substituant en Y

OPs aliphatiques	OPs a cycle phényle	OPs à heterocycle
dichlorvos, malathion, acéphate, déméton, dicrotophos, diméthoate, éthion, formothion, mévinphos, monocrotophos, naled, ométhoate, phorate, phosphamidon, trichlorfon	phosalone, parathion, éthyl parathion, méthyl parathion, bromophos, chlorfenvinphos, fénitrothion, fenthion, fonofos, isofenphos, profénofos, protiophos	chlorpyrifos, diazinon, étrimfos, isoxation, quinalphos, méthidation, phosmet

Les OPs sont utilisées sur tous types de cultures : céréales, coton, légumes, arbres fruitiers, vigne, tabac et autre. La pulvérisation sans protection sur de large surface représente la principale circonstance d'intoxication. Les OPs sont également utilisées à faible concentration comme insecticides domestiques en aérosols, plaquettes, diffuseurs.

L'exposition de la population générale, extrêmement faible, provient des résidus dans les aliments. Les OPs sont couramment employés comme anti parasitaire externe, vétérinaire (lutte contre les tiques, puces et poux) et humains (traitement de la gale et des pédiculoses par Para Plus, Prioderm), sans effet indésirable majeur, ils ont été développées initialement comme arme chimique [37].

Leur mécanisme d'action neurotoxique implique l'inhibition de l'Acétylcholinestérase (AChE). Cette inhibition se réalise lorsque les OPs vont se fixer sur le groupe hydroxyle du site actif de l'AChE, ce qui empêche la liaison de cette enzyme avec l'acétylcholine [36].

L'AChE est une enzyme estérase nécessaire au fonctionnement des synapses du système nerveux central et de la jonction neuromusculaire.

L'inhibition de cette enzyme provoque une accumulation de l'acétylcholine libérée dans la fente synaptique lors d'une stimulation nerveuse, menant à une hyperstimulation des récepteurs cholinergiques. En conséquence, le passage de l'information nerveuse est perturbé jusqu'au non fonctionnement des synapses ce qui peut mener à l'apparition de divers troubles nerveux pouvant aller jusqu'à la mort de l'individu [36].

L'absorption des OPs se fait par plusieurs voies ; cutanée (la voie de pénétration la plus importante), pulmonaire (exposition à des aérosols de pesticides) et orale (ingestion accidentelle ou volontaire).

La transformation rapide ne permet pas vraiment de quantifier l'absorption, surtout avec la variabilité des molécules ; les données d'excrétion indiquent qu'au moins 85% d'une dose orale sont adsorbés pour le dichlorvos, et 30% pour le parathion par exemple.

La plupart des produits sont rapidement distribués dans l'ensemble de l'organisme. Ils ne s'accumulent pas dans les graisses. Il est cependant possible, lors d'intoxications massives, au cours desquelles l'individu survit, l'accumulation du produit dans certains tissus, soit responsable de rechutes après quelques heures à quelques jours.

Les métabolites des OPs sont transformés dans le foie, par différentes voies hépatiques. Ils sont ensuite détoxifiés par hydrolyse enzymatique, en donnant alors des métabolites spécifiques à chaque OPs, mais aussi des alkylphosphates, métabolites communs à de très nombreux OPs [32].

Tableau 3 : Métabolites spécifiques des organophosphorés

Pesticides OPs	Métabolite spécifique
Isazofos-méthyl et -éthyl	5-chloro-1,2-dihydro-1-isopropyl-[3H]-1,2,4-triazol-3-one
Coumaphos	3-chloro-4-méthyl-7-hydroxycoumarine
Pyrimiphos-méthyl	1,2,3-benzotriazin-4-one
Diazinon	2-isopropyl-6-méthyl-pyrimidin-4-ol
Malathion	acide 2-[(diméthoxyphosphorothioyl) sulfanyl] succinique
Parathion-méthyl et -éthyl	4-nitrophénol ou paranitrophénol
Fénitrothion	3-méthyl-4-nitrophénol
Acéphate	Méthamidophos
Chlorpyriphos-méthyl et -éthyl	3,5,6-trichloro-2-pyridinol

Les métabolites des OPs sont éliminés très largement dans les urines (à plus de 50%), de façon rapide, mais aussi dans les sécrétions fécales et par l'air expiré pour les OPs et leurs métabolites les plus volatils. Ainsi après ingestion, 30 à 40% du parathion est éliminé en 24h. Après absorption cutanée, l'excrétion est plus lente (10% en 5 jours). Il s'accumule dans les graisses [37].

Une des principales raisons pour lesquelles ces substances insecticides sont plus toxiques pour les insectes que chez les mammifères adultes, dont l'Homme, provient des capacités métaboliques de chacun et des voies de métabolisation [36]. En effet, les insectes possèdent comme voie majeure de métabolisation celle de la bioactivation, dans laquelle les OPs sont transformés en oxon, leur métabolite actif. Au contraire, les mammifères privilégient les voies de détoxification directe et ont une voie de détoxification des oxons bien développée[36].

1.3.3 Les carbamates

Les carbamates et les organophosphorés (insecticides) représentent les deux classes majeures de pesticides utilisés comme : herbicides, insecticides et fongicides [38].

Les carbamates d'autre part sont moins toxiques mais très efficaces. Comme les OPs, les carbamates exercent leur action toxique en inhibant l'AChE. L'inhibition de l'AChE par les OPs est généralement irréversible tandis que l'inhibition par les carbamates est réversible. Par conséquent, les carbamates sont moins toxiques que les composés organophosphorés. L'exposition humaine aux deux groupes de composés peut être surveillée en déterminant l'activité des cholinestérases érythrocytaire et plasmatique [39]

Les recherches sur les produits chimiques qui exercent une action anticholinestérase sur le système nerveux semblable aux OPs ont conduit dans les années 1950 au développement des insecticides carbamates. Ils sont des dérivés de l'acide carbamique, HO-C(=O)-NH_2 . Ils ont une formule générale (figure2) dans laquelle R représente un alcool, une oxime ou un phénol et R1 représente l'hydrogène ou un groupe méthyle.

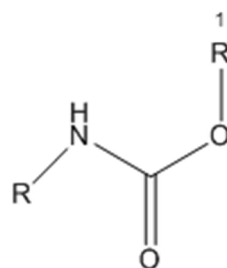


Figure 2 : La structure générale des carbamates

Les carbamates varient dans leur spectre d'activité, la toxicité des mammifères et leur persistance. Ce sont des composés relativement instables qui se décomposent dans l'environnement en quelques semaines ou quelques mois. Les carbamates sont couramment utilisés comme pulvérisations de surface ou appâts dans le contrôle des parasites du ménage.

Le carbaryl, le premier carbamate réussi, a été introduit en 1956. Deux qualités distinctes en font un insecticide largement utilisé. Tout d'abord, il a très faible toxicité mammalienne, orale et cutanée. Deuxièmement, il a un spectre assez large de lutte contre les insectes. Cela a conduit à son utilisation large comme un insecticide pelouse et jardin. Le propoxur est très efficace contre les blattes qui ont développé une résistance aux OPs. Il est couramment utilisé par les opérateurs de lutte antiparasitaire pour le contrôle des cafards et autres insectes domestiques dans les restaurants, les cuisines et les maisons. Le bendiocarb a surtout été utilisé comme insecticide domestique, gazon et ornemental. Methomyl est souvent appliqué comme un appât de mouche adulte. Plusieurs carbamates ont une utilisation systémique dans les plantes parce qu'ils ont une solubilité élevée dans l'eau qui leur permet d'être pris par les racines et dans les feuilles des plantes.

Le mode d'action des insecticides carbamates est très similaire à celui des OPs, car ils inhibent les enzymes cholinestérasiques. Cependant, ils diffèrent en action par rapport aux OPs car dans le cas des carbamates, l'effet inhibiteur sur la cholinestérase est bref.

L'inversion de l'effet des carbamates est si rapide que les mesures des taux sanguins de cholinestérasés chez les êtres humains ou d'autres animaux exposés aux carbamates sont susceptibles d'être inexacts et toujours dans le sens d'apparence normale.

Pour évaluer l'exposition aux carbamates, il est nécessaire que l'échantillon de sang soit prélevé le même jour de l'exposition et que l'analyse soit effectuée le plus tôt possible afin de minimiser toute inversion dans l'échantillon recueilli. La recherche métabolique est recommandée pour cette situation (Tableau) [32].

Chez les insectes, les effets des carbamates sont principalement ceux de l'empoisonnement du système nerveux central où l'on pense que les réactions cholinergiques ont lieu. Cependant, la jonction neuromusculaire insecte n'est pas cholinergique, comme c'est le cas chez les mammifères. Les carbamates sont utilisés comme poudres ou pulvérisations. Ils peuvent être absorbés par la peau ainsi que par l'ingestion et l'inhalation. L'effet toxique immédiat des carbamates est très similaire à celui des OPs, mais la récupération est relativement rapide. La récupération spontanée sans traitement médical survient généralement dans les 4 heures suivant une exposition qui a produit des symptômes et des signes de maux de tête, d'étourdissements ou de vertiges, de

faiblesse, de salivation excessive, de nausées ou de vomissements. Des symptômes et des signes plus sévères induisent généralement un traitement médical. Les individus ont récupéré de l'empoisonnement qui a produit de tels symptômes et des signes comme les troubles visuels, transpiration abondante, douleur abdominale, incoordination, fasciculations musculaires, des difficultés respiratoires ou des changements dans le pouls.

Il n'y a aucune preuve de carbamates causant la neurotoxicité retardée comme on le voit avec certains des composés OPs. Les carbamates ne sont pas considérés comme des substances mutagènes, carcinogènes ou tératogènes.

Tableau 4: Les métabolites des carbamates

Les carbamates	Les métabolites
Aldicarbe	Aldicarbe sulfoxyde Aldicarbe sulfone
Carbaryl	1-naphthol
Carbofuran	3-hydroxycarbofuran, carbofuran-3-kéto, 3-hydroxycarbofuranphénol, carbofuranphénol, carbofuranphénol-3-kéto
Furathiocarbe Carbosulfan Benfuracarbe	Carbofuran
Thiodicarbe	Méthomyl
Pirimicarbe	2-diméthylamino-5,6-diméthyl-4-hydroxypyrimidine (DDHP), 2-méthylamino-5,6-diméthyl-4-hydroxypyrimidine (MDHP), 2-amino-5,6-diméthyl-4-hydroxypyrimidine (ADHP)
Propoxur	2-isopropoxyphénol (2-IPP)

1.3.4 Les pyréthroides

Les pyréthroides sont des insecticides naturels trouvés dans les fleurs de « chrysanthemum » qui sont communément utilisés pour leur grande toxicité envers les insectes et la faible toxicité envers les mammifères. Ils ont tendance à remplacer les OPs et les carbamates qui sont considéré très toxiques pour les humains.

Les pyréthroides ont des actions sur le système nerveux de l'insecte par le blocage des canaux de sodium des fonctions des neurones par l'interaction avec la chaîne du Sodium. Chez les humains ces composés sont rapidement métabolisés

Selon Leng et al. le composé parent à une concentration très faible dans le sang par rapport aux concentrations des métabolites dans les urines. Donc, une surveillance des pyréthroides synthétisé recommande la détermination des métabolites dans les urines [40].

Les pyréthroides sont rapidement métabolisés dans le foie donnant naissance à des molécules inactives. Généralement, le temps d'élimination est très court d'environ 6 heures. Selon Dulaurent, plusieurs auteurs ont confirmé cette constatation. D'ailleurs, Leng et al. ont quantifié des métabolites dans les urines [32]. Les principaux pyréthroides et pyrèthres ainsi que leurs métabolites urinaires, sont présentés dans le Tableau 5.

Tableau 5: Les métabolites urinaires de pyréthroides de synthèse et le composé parent correspondant

Les métabolites	Les composés parents
3-PBA	Acrinathrine, λ -cyhalothrine, cyperméthrine, deltaméthrine, tau-fluvalinate, Perméthrine
F-PBA	Cyfluthrine
MPA	Bifenthrine
cis et trans-Cl ₂ CA	Cyfluthrine, cyperméthrine, perméthrine
Br ₂ CA	Deltaméthrine
CDCA	Alléthrine, bioalléthrine, cinérine I et II, jasmoline I et II, phénothrine, pyrèthrines I et II, resméthrine, tétraméthrine
CF ₃ CA	λ -cyhalothrine
4OH3PBA	Cyperméthrine
2-CIBA	Fenvalérate

Cis et trans-Cl₂CA : acide cis et trans-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-diméthylcyclopropane-1-carboxylique, 3-PBA : acide 3-phénoxybenzoïque, 4OH₃PBA : acide 3-(4'-hydroxyphénoxy)benzoïque, CDCA : acide E-cis/trans-chrysanthémumdicarboxylique, MPA : acide 2-méthyl-3-phénylbenzoïque, Br₂CA : acide cis-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-diméthylcyclopropane-1-carboxylique, 2-CIBA : acide 2-(4-chlorophényl)-3-méthylbutyrique, FPBA : acide 4-fluoro-3-

phénoxybenzoïque, CF_3CA : acide 3-(2-chloro-3,3,3-trifluoroprop-1-ényl)-2,2-diméthylcyclopropane-1-carboxylique.

La pénétration des pyréthroides percutané est faible. En cas d'ingestion d'une dose importante de ces molécules, plusieurs symptômes surgissent à savoir ; des troubles digestifs (douleurs abdominales, vomissements, diarrhée) associés à des troubles neuromusculaires (fatigue musculaire, fasciculations, tremblements, myoclonies, convulsions). Des troubles respiratoires et de la conscience peuvent être associés, provoqués par les excipients du produit. Le traitement est symptomatique, non spécifique [41]

2 Les pesticides au Maroc

2.1 Consommation des pesticides au Maroc

En Afrique, la part du marché mondial des pesticides est de 1,5 milliard de dollars en 2008. Il s'agit d'une importation marocaine de 17134 tonnes de pesticides voir une somme de 799 millions de Dirhams. [1]. Il y a une estimation de plus de 1,5 Kg de pesticide utilisé par hectare en 2015 selon les données de l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) (Figure 3) [42].



Figure 3: Utilisation des pesticides en fonction de la superficie des cultures au Maroc

2.2 Législation des pesticides au Maroc

Pour l'importation, la fabrication ou la vente des pesticides à usage agricole, le ministère de l'Agriculture et de la Pêche Maritime à travers l'Office National de Sécurité Sanitaire des Produits Alimentaires (ONSSA) délivrent des attestations d'homologation. L'accord de l'homologation

vient après un examen de la toxicité du pesticide, envers l'homme, les animaux et l'environnement.

Au début de l'année 2020, le Conseil du gouvernement a adopté le projet de loi 35-19 relatif aux pesticides agricoles. A son entrée en vigueur, cette nouvelle loi va abroger et remplacer la loi 42-95, pour répondre aux nouvelles problématiques sanitaires suite au mésusage des pesticides et des résultats de l'évaluation des risques de santé publique et environnementaux

En septembre 2006, l'OMS a recommandé l'utilisation du DDT pour contrôler le malaria. Cet insecticide est plus puissant que les autres nouvelles formulations. Pour appliquer cette décision il faut bien surveiller les effets négatifs sur la santé humaine, et aussi il faut s'assurer que le DDT ne contamine pas les cultures agricoles [43].

Depuis 1972, les pays développés ont interdit ces pesticides à cause de leurs toxicités sur l'écosystème et l'environnement. Au Maroc, l'interdiction a commencé après en 1984. Pourtant, le lindane et le DDT sont toujours approuvés par la santé publique. Mais la législation marocaine est incomplète en ce qui concerne le contrôle des stocks, les conditions et la durée de stockage. [44]

Plusieurs études ont confirmé la présence des pesticides dans plusieurs matrices alimentaires et environnementales. Le DDT a été quantifié dans les eaux des puits [45] et les lagunes de Oualidia [46]. De même, les DDT et ses métabolites, les isomères du HCH, Aldrin, Endrin, Dieldrin, Heptachlor et Heptachlore epoxide sont trouvés dans des sédiments collectés de la côte atlantique [47]. De plus, l'analyse chromatographique de 15 puits d'eau souterraine a identifié une contamination importante par les organochlorés [48].

Le lindane et le DDT et leurs métabolites ont été trouvés dans des cigarettes marocaines avec des concentrations qui varient entre 9 et 13 ng g⁻¹, dans le cadre d'une étude faite sur 11 pays du monde [49]. A la vallée de Souss Massa, des organochlorés et des pyréthroides sont détectés dans des échantillons de tomates en 2012 [50].

2.3 Les pesticides dans la santé publique et hygiène

Ce type de pesticide catégorise toutes les molécules susceptibles de lutter contre les nocifs qui menacent la santé publique ; dans la lutte anti-vectorielle, les insecticides, les raticides domestiques et les pesticides de déparasitage utilisés par les professionnels.

Au Maroc, ces pesticides sont utilisés par le ministère de la santé, les collectivités territoriales, les opérateurs de désinfection et de désinsectisations et aussi une grande large de la population générale.

Leurs utilisations est régit par des consignes et des règles à respecter, car les mésusages peuvent influencer, la santé des utilisateurs, de la population générale mais aussi l'environnement.

En 2015, un projet de loi a été élaboré relatif à la gestion des pesticides utilisés pour la santé et hygiène publique. Il a été validé et envoyé pour approbation par le comité interministériel de la gestion intégrée de la lutte anti-vectorielle (GILAV)

En 2016, une analyse de la base de donnée des pesticides utilisé pour la santé publique a donné que 66,5% sont des insecticides, 31,7% sont des raticides et le reste sont des attractifs et moustiquaires. La majorité de ces produits sont à usage professionnel [51].

Chapitre 2 : Exposition aux pesticides chez l'humain

L'intoxication est un état consécutif à la prise d'un xénobiotique et entraînant des perturbations de la conscience, des facultés cognitives, de la perception, du jugement, de l'affect ou du comportement, ou d'autres fonctions et réponses psychophysiologiques [52]. Les intoxications par les pesticides sont de plus en plus nombreuses dans le monde, vue l'utilisation massive par les professionnels et aussi par les informels. L'OMS met en garde contre les dangers liés à l'utilisation et à l'exposition aux pesticides [53]. La toxicité des pesticides a été clairement démontrée pour modifier une variété de fonctions physiologiques [54]. On pourra parler de deux types d'intoxications, les intoxications chroniques et aiguës. Toutes les deux dépendent du temps d'exposition au toxique, la fréquence et la dose.

1 Intoxications aiguës causées par les pesticides

Les intoxications aiguës par les pesticides suscitent l'intérêt de la santé publique dans le monde entier. Elles sont sources de mortalité avec des chiffres alarmants qui peuvent aller à 5 millions décès par an selon l'OMS [54].

L'intoxication aiguë est un phénomène transitoire : son intensité décroît et ses effets se dissipent progressivement quand le sujet arrête de consommer la substance en cause. L'intoxication aiguë dépend habituellement de la dose et l'état de santé des personnes exposées. La guérison est donc complète, sauf dans les cas ayant entraîné des lésions organiques ou d'autres complications [52]. Ce genre d'intoxication se reporte à plusieurs signes et symptômes comme les maux de tête, les nausées, les vomissements, les étourdissements, la fatigue anormale, la perte d'appétit et les irritations cutanées, oculaires ou respiratoires.

La plupart des intoxications aiguës sont soit le résultat d'une mauvaise utilisation, soit celui d'une intoxication volontaire. En milieu rural en particulier, les intoxications suicidaires ne sont plus exceptionnelles et leur nombre est souvent sous-estimé. En effet, faute de moyens, ce type d'intoxications par les pesticides ne sont pas toujours bien diagnostiquées ni bien documentées [24].

En fait, au Sri Lanka 90% des suicides sont dus à l'ingestion des pesticides délibérés, le rapport de l'OMS annonce que les pesticides sont maintenant la méthode la plus courante de suicide dans le

monde entier [54] . En général, les insecticides présentent une plus forte toxicité aiguës pour l'homme que les herbicides ou les fongicides. En Tunisie, l'intoxication par les OPs représente 11 % de l'ensemble des intoxications aiguës vues aux urgences d'un centre de référence en toxicologie à Tunis [55].

1.1 Les intoxications aiguës par les pesticides à l'échelle internationale

A l'échelle internationale, les pesticides sont connus par leur forte utilisation dans les cas de suicide. Une revue faite depuis 27 études sur 16 pays du monde (Bangladesh, Colombie, Inde, Jordanie, Sri Lanka, Danemark, Finlande, Allemagne, Grèce, Hongrie, Ireland, Japon, Korea du Sud, Taiwan, UK, et USA) sur l'interdiction nationale des pesticides et les limitations des ventes pour diminuer la disponibilité de ces molécules. Une interdiction internationale dans le monde entier peut particulièrement prévenir des dizaines de centaines de décès chaque année [56].

La disponibilité des pesticides hautement toxiques dans les domestiques des agriculteurs par exemple a fait de ces molécules un choix facile pour les tentatives de suicide avec un grand nombre de décès. De même, l'utilisation excessive des pesticides expose les populations, à long terme, à problèmes de santé grave et chronique [57].

Particulièrement, les intoxications par les insecticides organophosphorés sont mortelles dans 4 à 30 % de cas aux Etats Unis [58].

Ces intoxications représentent toujours un problème de santé publique surtout dans les pays en voie de développement. Ils rassemblent 99 % de l'ensemble des intoxications, du fait de la facilité de production de ces produits et du manque de réglementation. Les intoxications par insecticides représentaient ainsi 50 % de la totalité des intoxications au Sri Lanka [54]. La gravité de ces intoxications implique un traitement rapide en milieu spécialisé. Presque 500000 décès par suicide sont compté chaque année dans la région de l'Asie pacifique. Environ 60% de ces décès sont causés par l'utilisation des pesticides pour le suicide (Chine, Sri Lanka), ce qui rend le traitement difficile. Une régularisation de la disponibilité des pesticides pourra avoir un impact sur les suicides en zone rural en Asie [3], [59]–[61].

Il existe un manque de données liées aux méthodes spécifiques de haute qualité dans les pays d'Afrique particulièrement, une région dont les données sont sous estimées [62].

L'utilisation de pesticides moins dangereux peut minimiser les décès causés par ces molécules [63].

Une analyse sur trois ans au Portugal dans le laboratoire de toxicologie, a présenté 639 demande d'analyse de pesticides dont 389 sont testés positives. Les OPs sont la cause de ces empoisonnements [64]

En Iran, une étude entre 2003 et 2004 a été menée dans le centre de la médecine légale. Entre 3885 autopsies enregistrées dans le laboratoire de toxicologie en relation avec des analyses liées aux pesticides, seulement 1,31% (N=51) des décès sont causés par ces molécules [65]

Il existe toujours une difficulté de diagnostic des intoxications par les organophosphorées surtout dans les pays en développement [66]. D'ailleurs une intoxication a été diagnostiquée causée par les organophosphorés mais les examens analytiques ont montré que c'était à cause de l'amitraz [67].

En France, les centres du contrôle des poisons continuent à recevoir des cas d'intoxication par des substances interdites dans le pays. Il s'agit de 408 de cas recensés entre 2012 et 2016. Les molécules incriminées dans ces intoxications sont par ordre d'abondance ; dichlorofos, paraquat, alicarb, diuron, dinocap, methomyl, carbofuran, anthraquinone carbendazim. Le paraquat, aldicarb et carbofuran étaient les responsables des cas critiques reçus [68]

1.2 Les intoxications par les pesticides en Afrique

Selon l'OMS, les intoxications par les pesticides donnent des taux de morbidité et de mortalité élevés en Afrique et particulièrement l'Afrique de l'Est. D'ailleurs, une estimation d'environ 7800 décès est recensés en Afrique suite à une ingestion accidentelle des pesticides [69].

En Algérie, 1136 cas d'intoxications volontaires et accidentelles par le carbofuran ont été notifiées par le Centre antipoison d'Alger, entre 1998 et 2008 [70]. Au CHU de Setif cette fois, 184 cas d'intoxications par les pesticides ont été enregistrés entre 2008 et 2012 [71].

En Tunisie, une étude de 19 ans sur les cas mortels causés par une intoxication par les pesticides, entre 1991 et 2009. 126 cas de décès ont été collectés dont la moitié est causé par les carbamates et 31.5% par les OPs, après une confirmation par un screening toxicologique [72]. Entre 2013 et 2016, 50 cas d'enfants intoxiqués par les pesticides ont été collectés [73]. 52 cas d'intoxication par le méthomyl entre 2009 et 2012 admis aux urgences du Centre d'assistance médicale d'urgence de Tunis, dont la majorité était volontaire. Sept cas sont décédés [74].

D'ailleurs, 20% des cas reçus d'intoxications chez les enfants en Tunisie entre 2014 et 2018, sont causés par les pesticides. Les bébés marcheurs entre 1 an et 5 ans ont été les plus touchés [75].

Les pesticides sont très utilisés pour tentative de suicide chez les femmes enceintes. D'ailleurs, 7 cas sont publiés par Barhoumi et al. en Tunisie. Plus de la moitié des cas a connu la mort du fœtus [76].

Balme et al. ont publié une étude de 311 cas d'intoxications par les pesticides en Afrique du sud entre 1987 et 2008 avec 6 décès. Les OPs et les carbamates sont la cause de 65% des cas [77].

1.3 Les intoxications aiguës par les pesticides au Maroc

Le CAPM recense annuellement le nombre des intoxications reçues, depuis tout le royaume, et publie les données dans la revue « Toxicologie du Maroc » sous forme de rapport. Les intoxications par les pesticides sont classées à plusieurs reprises dans les premières positions par rapport aux autres types d'intoxications.

En 2018, le centre a publié une étude sur les intoxications aiguës par les pesticides durant la période entre 2008 et 2016. Il s'agit de 11 196 cas d'intoxications, soit 10,7% de l'ensemble des cas collectés pendant la même période [78].

Les intoxications accidentelles représentent 59,2% alors que les tentatives de suicide sont de 38,7 %. Les insecticides sont responsables de 54% des cas d'intoxications dont 20% sont des organophosphorés. Pour les décès, les insecticides sont incriminés dans 53,5 % des cas.

Grâce aux campagnes de sensibilisation le nombre des intoxications déclarés et notifié au niveau de CAPM à augmenter considérablement entre 2008 et 2016 (Figure 4). Une étude rétrospective a été élaborée à partir des données du CAPM de 1992 et 2007 [2].

Cette étude montre une augmentation du nombre des appels de déclaration d'intoxication. De tel, pendant 15 ans, le centre a reçu 2609 appels notifiant les intoxications par les pesticides seulement. Les insecticides étaient impliqués dans 54,3 % des cas suivis par les raticides (34 %). Les organophosphorés étaient la classe chimique la plus retrouvée (30 %). Les raticides minéraux représentaient la cause la plus fréquente de décès.

Ce nombre de déclaration, au CAPM est très sous-estimé et ne reflète pas le problème réel. Il existe effectivement des limites liées à l'absence de la culture de déclaration par téléphone surtout en milieu rural.

Les intoxications accidentelles sont les plus fréquemment reçues et elles résultent souvent du mésusage et du déconditionnement des produits. En effet le non-respect des règles minimales pour le conditionnement et l'utilisation des contenants vides de pesticides pour stocker de l'eau et des denrées alimentaires pourraient augmenter le risque d'erreur et d'intoxication. De même, la manipulation inadéquate des pesticides par les agriculteurs, qui n'utilisent pas un équipement de protection individuelle approprié et le non-respect des conseils de prudence contenus dans les étiquettes des produits contribuent aussi à l'intoxication par pesticides [78].

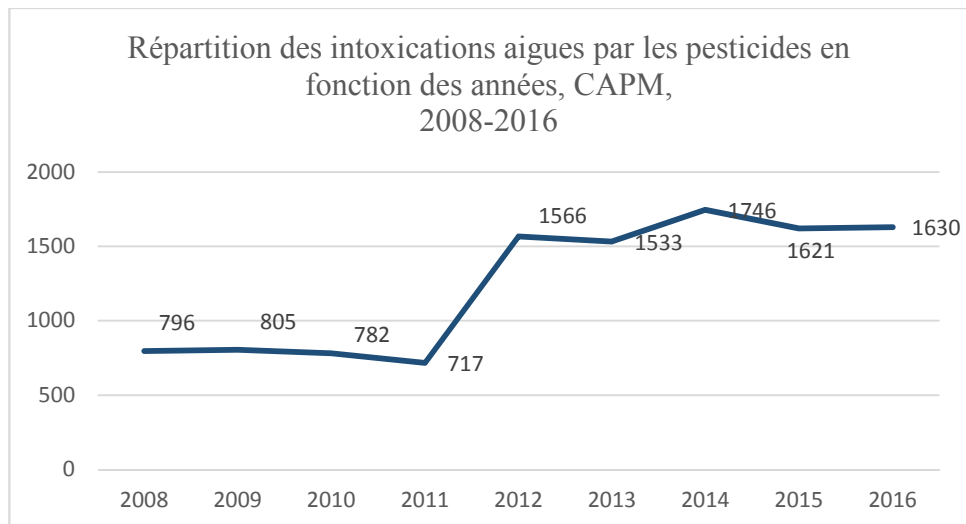


Figure 4: Répartition des intoxications aiguës par les pesticides en fonction des années, CAPM, 2008-2016

Les intoxications suicidaires ont été décrites chez 3114 cas notifiés au CAPM entre 2000 et 2008 chez les jeunes marocains de plus de 15 ans et de moins de 34 ans [79].

Cette étude montre que les pesticides sont la deuxième option utilisée pour leurs attentats. Pourtant, selon les auteurs, ses chiffres ne reflètent guère le nombre réel des intoxications volontaires au Maroc. Une étude rétrospective présente 28 cas d'intoxications aiguës sévères, par les pesticides, admis en réanimation au CHU de Fès entre 2003 et 2010. La tentative de suicide était le principal motif d'intoxication (19cas). La mortalité globale était de 25%. Les pesticides organophosphorés sont les toxiques agricoles, le plus souvent incriminés. Le diagnostic biologique a été réalisé par le dosage de l'activité cholinestérasique dans le plasma [80].

De même, des intoxications par le chloralose reçu à de l'hôpital universitaire Hassan II de Fès entre 2011 et 2015, ont été confirmées par la méthode analytique Fujiwara-Ross [81]

Ces intoxications par les pesticides peuvent être mortelles. A l'Institut National d'Hygiène (Maroc), entre 2000 et 2005, 130 cas ont été recensés [82].

Les insecticides (organophosphorés, organochlorés et carbamates) sont les plus incriminés dans ces intoxications (75,2 %) suivis de phosphore d'aluminium (21,5 %). Un cas d'intoxication aux pyréthroïdes et un cas de raticide coumarinique sont retrouvés.

En réanimation au CHU Ibn Sina de Rabat, une étude rétrospective analytique des intoxications aiguës graves, pendant une période de 5 années, a été menée. Il s'agit de 214 patients. Les organophosphorés représentaient la principale cause d'intoxication (41,6 %). L'intoxication était suicidaire dans 86,4 % des cas. Le taux de mortalité était de 22 % dont la cause principale était le choc cardiogénique (53,2 %) [83].

1.4 Les intoxications par les pesticides chez les enfants

Achour et al. ont mené une étude en 2011, qui s'est intéressée aux intoxications aux pesticides chez les enfants marocains de moins de 14 ans [84]. L'étude a rassemblé 2672 entre 1990 et 2008. Cette étude uni-variée a trouvé que la plus part des intoxications étaient accidentelles (87.1%). De plus les organophosphorés sont la première famille incriminée chez les enfants (50%) suivit par l'alpha-chloralose (26.5%).

Beaucoup d'études se sont intéressées aux intoxications par les pesticides chez l'enfant. Ces intoxications sont souvent par voie orale après une ingestion accidentelle. Les marqueurs classiques d'intoxication par organophosphorés, par exemple, chez l'adulte (hyper salivation, larmoiement, perte d'urine et de selles) sont difficilement interprétables chez le jeune enfant, ce qui rend le diagnostic difficile [85]–[89].

La région de Fés Boulmane, entre 1980 et 2007, a connu 796 cas d'intoxications [90].

Pour la même durée, 1267 cas ont été hospitalisés en pédiatrie dans la région Tadla Azilal. Presque 12% de ces cas sont causés par les pesticides. Seulement 10 décès ont été enregistrés durant la période de l'étude.

Récemment, une étude de 2008 à 2014 a trouvé un nombre de 1745 d'intoxications par les pesticides chez les enfants. La majorité de ces cas sont signalés depuis le milieu urbain marocain. Presque toutes les intoxications étaient accidentelles [91].

Des données d'intoxication par les pesticides ont été rassemblées des registres de soins sanitaires traitant les enfants ensuite une enquête auprès des familles à Borgou au Bénin. Cette étude s'est déroulée en 2010 et 2011. Les enquêtes ont montré que l'enosulfan était le plus incriminé dans ces cas d'intoxication [92]. Ces résultats montrent qu'il existe une certaine faible protection des enfants envers les pesticides.

2 Exposition professionnelle aux pesticides et intoxications chroniques

L'intoxication chronique survient normalement suite à l'absorption répétée de faibles doses de la substance. Le délai avant l'apparition des symptômes ou d'une maladie peut parfois être long, d'ailleurs, les effets sur la santé peuvent même se manifester après plusieurs années, ce qui rend le lien difficile à faire entre les effets et la cause [43]. Les symptômes d'une intoxication chronique sont souvent difficiles à reconnaître, ils peuvent parfois s'apparenter aux effets d'une intoxication

aiguë. Certains pesticides pourraient avoir des effets perturbateurs du système endocrinien en interférant avec le processus hormonal. Ils peuvent ainsi occasionner des changements dans la croissance, le développement, la reproduction, ou le comportement des organismes eux-mêmes ou sur les générations suivantes. Parmi les pesticides soupçonnés d'avoir de tels effets : le 2-4D, le malathion, la perméthrine, le benomyl [93]. Des données suggèrent que l'exposition aux pesticides augmente le risque de cancer et les maladies neurodégénératives[54]. De même la pulvérisation répétée d'insecticides déclenche le syndrome parkinsonien par le traitement, un cas été traité en littérature chez un homme exposé depuis 10 ans [94].

2.1 Surveillance biologique – Biomonitoring

La surveillance biologique est devenue très utilisée ces dernières années pour décrire l'exposition et la dose interne des éléments chimiques e dans par la mesure dans les échantillons biologiques humaines. La première surveillance biologique a été faite pour décrire une exposition au plomb en 1972. Plusieurs produits chimiques ont des demi-vies courtes dans l'organisme. D'ailleurs, leur métabolisme rapide rend leur détection dans le sang très difficile. De tel, la connaissance du temps du prélèvement est primordiale dans cette surveillance, si non les résultats donneront des conclusions qu'il n'existe aucune exposition alors qu'il s'agit juste d'une analyse faite après la disparition des éléments recherchés dans le sang. Les urines sont devenues la matrice optimale pour une surveillance biologique, mais il est prioritaire de chercher les métabolites à côté de la molécule mère. L'évaluation des risques sur la santé par une surveillance biologique est possible quand la relation entre les effets et la concentration du biomarqueur est connue [95].

Le biomonitoring dans les cheveux est autant utilisé pour les pesticides. Cette investigation permet d'avoir des concentrations considérables surtout que cela est possible aussi chez les non-exposés directement aux pesticides. D'ailleurs, une détection des OCs, des Ops et pyréthroides a été faite. L'évaluation de l'exposition dans les matrices biologiques nécessite une grande sensibilité contrairement aux expositions aiguës où les concentrations sont plutôt élevées. Cette sensibilité doit être couplée à la sélectivité qui est généralement assurée par les techniques de détection comme la spectrométrie de masse et en tandem qui réduit le risque des faux positifs [96].

Selon Barr et al. [96] les biomarqueurs d'exposition sont devisés en 3 groupes (Figure 5) :

- La dose potentielle ou la dose externe est estimée d'après l'estimation de toutes les sources qui peuvent être cause d'exposition externe de l'individu.
- La dose interne est l'estimation de la dose/quantité absorbée par le corps par la mesure des pesticides, leurs métabolites ou bien les réactions dans les matrices biologiques.

- La dose biologique effective est déterminée par l'estimation de la dose nécessaire du toxique pour que l'individu ait un effet sur sa santé.

Les biomarqueurs d'exposition sont nombreux et se différencient d'une famille de pesticides à une autre et même d'une molécule à une autre (famille des pyréthroides), ce qui rend la tâche plus difficile.

Les effets sur la santé sont largement étudiés par les scientifiques dans le domaine, et confirme ue les effets sont liés à la dose et le moyen d'exposition. Pourtant, plusieurs effets toxicologiques sur la santé humaine restent toujours ignorés parce que les pesticides sont utilisés sous forme de mixture.

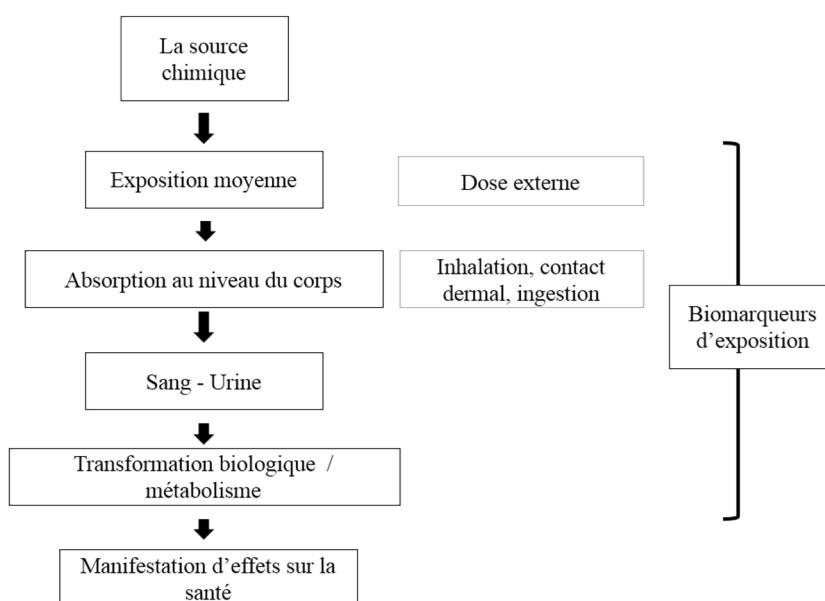


Figure 5: Représentation schématique de la route d'un toxique depuis l'exposition vers l'effet sur la santé

Cette surveillance peut se faire chez tous les types ou catégories de population, population générale, dans le milieu professionnel (travailleurs, agriculteurs.. etc), population non exposée, les enfants ou les femmes.. etc [96].

Il existe toujours des limitations liées à la surveillance biologiques dans les matrices biologiques humaines, à savoir ; la difficulté de trouver des participants dans les études, surtout dans le cas des grands groupes, et les questions d'éthiques.

Les premiers biomarqueurs d'exposition aux organophosphorés dans les matrices biologiques sont ; le dialkyl phosphates (DAPs), dimethylphosphate (DMP), diethylphosphate (DEP), dimethylthiophosphate (DMTP), diethylthiophosphate (DETP), dimethyldithiophosphate (DMDTP) et diethyldithiophosphate (DEDTP)[97]–[100].

2.1.1 La mesure de l'activité cholinestérasique

La détermination de l'activité cholinestérasique (AC) est importante pour confirmer l'intoxication par les OPs et pour suivre le déroulement thérapeutique après traitement. Le degré d'inhibition détermine la sévérité de l'intoxication. Ce degré dépend de la valeur normale caractérisant la variation entre les différentes populations.

D'ailleurs, une étude s'intéresse à déterminer la valeur de référence de l'AChE et la BChE chez une population de 851 individus volontaires sains de la république de la Serbie [101].

Brock et al., confirme qu'il existe des variations, interindividuelles et intra individuelles causés par le polymorphisme génétique, l'âge, le poids, le genre, la taille [102].

D'autres études, pourtant, examinant les niveaux d'activités de l'AChE et la BChE, montrent qu'il n'existe aucune différences de ces activités selon l'âge et le genre des participants [103], [104].

2.2 Etudes d'exposition chronique aux pesticides

Plusieurs études s'intéressent à élaboration des évaluations biologiques des pesticides.

Au Pakistan, des OCs ont été détectés chez 56 volontaires (pp-DDT, Aldrine, Dieldrine, endosulfane). Ils sont des enfants, des femmes, travailleurs, des agriculteurs et d'une population habitant loin de la zone agricole. La même étude à évaluer les risques d'exposition chez 179 volontaires ayant répondu à un questionnaire. Ils ont déclarés que leur utilisation des pesticides augmente chaque année (88,8%). De plus, 87,7% manipulaient les emballages non sécurisés des pesticides, 65,9% ont quelques notions sur l'utilisation des pesticides et 62,6% déclarent avoir utilisés des moyens de protection limitée [105]

En Tunisie, une étude sur 207 habitants de zone agricole (110 agriculteurs et 97 témoins), pour évaluer les risques liés à l'exposition aux pesticides. Cette investigation s'est intéressée à la mesure de l'activité cholinestérasique et la description des symptômes cliniques. Les signes neurologiques et dermatologiques sont les plus recensé chez les agriculteurs.

Les valeurs de l'activité cholinestérasique des agriculteurs sont inférieures à ceux des témoins.

Les signes neurologiques sont significativement associés aux expositions aux OPs et carbamates.

Ces signes sont moins significatifs chez les travailleurs exposés à des mélanges de pesticides.

Les valeurs de l'activité cholinestérasique dépendent de la nature des pesticides et de la durée et l'ancienneté d'exposition [106].

En 2020, une enquête a confirmé une grande utilisation des pesticides, généralement acheté depuis des ventes libres dans la province de Berrchid. Parmi les 100 agriculteurs enquêtés, 75

Tous les agriculteurs consultés utilisent les engrais et les pesticides. 75% des interviewés méconnaissent comment employer les pesticides dans leur culture.

Les auteurs recommandent de réaliser des programmes de sensibilisation pour corriger les écarts d'utilisation de ces produits, de plus il faut revoir les réglementations en relation, surtout celles liées à la limite des ventes libres. Ils conseillent également de se diriger vers les agricultures durables[107].

Au Pérou, une étude s'est intéressée à la détermination des OPs et leurs métabolites urinaires chez leurs manipulateurs. L'enquête s'est basée sur un questionnaire et l'exposition a été mesurée par la recherche de six métabolites des OPs (DMP, DMTP, DMDTP, DEP, DETP, et DEDTP) par la chromatographie gazeuse avec un détecteur photométrique. Parmi 33 participants, 76% ont au moins un seul métabolite dans leurs prélèvements. Aucune corrélation n'est trouvée entre l'utilisation des moyens de protection et l'absence des métabolites urinaires après analyse. La plupart des enquêtés n'étaient pas conscient de l'apport des moyens de protections dans la prévention des effets néfastes de ces molécules [108].

Une évaluation biologique de l'exposition individuelle due à une application professionnelle des pyrethoïdes. Une collecte d'urine de 24 heures chez 36 travailleurs en Allemagne, ayant utilisés ces molécules dans l'agriculture, des jardins, et dans les domestiques comme contrôle d'insecticides. Selon les auteurs, les concentrations trouvées sont loin des valeurs des doses journalières recommandées par l'OMS [109].

2.3 L'utilisation des moyens de protection contre les pesticides

Le comportement envers les pesticides a été étudié chez des 232 agriculteurs marocains. Selon les auteurs, les agriculteurs ont une grande expérience avec les pesticides mais n'utilisent pas de moyen de protection ou bien des moyens insuffisants ou usés.

Le niveau éducatif chez les agriculteurs est la variable qui influence le plus le comportement de sécurité pour cette étude. Berni et al. affirment que les agriculteurs sont conscient des effets néfastes de ces molécules et continuent d'utiliser des grandes quantités de pesticides et sans même se protéger [110].

Les moyens d'exposition sont par inhalation et par la peau. Les effets des pesticides sur les manipulateurs s'accroissent dans le cas de non utilisation des moyens de protection et les mésusages de ses produits. Pour minimiser les risques il faut choisir les PPEs appropriés.

L'OMS et la FAO ont annoncé en 2015 le Code de conduite international sur la gestion des pesticides qui contient toutes les consignes et les lignes directrices liées à la santé publique et le

contrôle des opérateurs des pesticides. Pour manipuler les pesticides, il faut utiliser les équipements de protection personnelle suivants : un écran facial ou un respirateur facial complet, respirateurs bien entretenus avec cartouches de rechange, combinaisons propres à manches longues, chapeaux lavables, protection des yeux et du visage, bottes résistantes aux produits chimiques, tabliers et gants [111].

Mais en réalité, les utilisateurs des pesticides ne respectent pas ces consignes et on se retrouve avec des vêtements (T-shirt et pantalon) misent plusieurs fois sans changement et aucun masque ou gant. Les travailleurs expliquent ce non utilisation par les conditions climatiques. D'autres déclarent qu'ils n'ont pas confiance par rapport à l'efficacité de ces équipements de plus ils voient qu'ils sont chers et donne une sensation de non confort lors du port [112].

En ce qui concerne les pratiques de sécurité des pesticides, les pratiques dangereuses fréquemment signalées étaient : manger et boire pendant l'application des pesticides, l'élimination inadéquate des contenants de pesticides vides, le stockage des pesticides à la maison, le non-respect de la concentration et de la quantité de pesticides indiqués sur l'étiquette, une hygiène personnelle inappropriée contact et procédures de blanchisserie inefficaces.

Une revue de littérature systématique publiée en 2020 s'est intéressée à l'étude des facteurs qui influencent l'utilisation des EPPs et les pratiques de sécurité des pesticides.

L'EPP de base portée par les manipulateurs de pesticides agricoles était une chemise à manches longues, un pantalon à manches longues, un chapeau, un masque, des bottes, des gants, des lunettes et un tablier. L'EPP le plus basique porté par les manipulateurs de pesticides dans toutes les régions du monde était une chemise à manches longues (66,1%), un pantalon à manches longues (71,1%) et un chapeau (47,3%). L'EPP de base le moins porté était un tablier (8,6%), des lunettes (24,3%), des gants (40,5%), des bottes (42,3%) et un masque (43,2%). Les manipulateurs de pesticides agricoles en Amérique du Nord avaient le plus élevé enregistré de tous les EPP de base (à l'exception des lunettes) par rapport aux autres régions.

Les combinaisons étaient les plus fréquemment portées parmi les manipulateurs de pesticides en Afrique, tandis qu'un respirateur était le plus souvent porté en Amérique du Nord.

Selon le même review systématique, la plupart des manipulateurs de pesticides, en particulier dans les pays en développement, ne portaient pas d'EPP lorsqu'ils travaillaient avec des pesticides, en particulier des gants, des lunettes et un tablier. D'un autre côté, le nombre de manipulateurs de pesticides en Europe portait les spécifications les plus élevées en matière d'uniforme spécial et de vêtements imperméables. Cela peut bien être dû au niveau de situation économique. Une explication possible étant que les manipulateurs de pesticides en Europe ont la possibilité

financière d'acheter des EPP et de choisir un EPP de meilleure qualité pour se protéger des pesticides, alors que les manipulateurs de pesticides dans la plupart des pays en développement n'ont pas les moyens de se le permettre.

Selon Sapbamrer et Thammachai, les déterminants significatifs pour l'utilisation des EPPs et les pratiques de sécurité des pesticides sont :

Les facteurs démographiques : le niveau d'étude, expérience de maladie et le revenu

Les facteurs de structure du milieu du travail : la superficie, l'organisation..

Les facteurs comportementaux et psychosociaux : le contact avec les pesticides, les perceptions, les attitudes, la sensibilisation, les normes et les croyances.

Les facteurs environnementaux : l'information, l'accès aux services d'extension, les stages, l'organisation des fermes, le logement, les conditions du milieu du travail.

Dans le cadre de la surveillance des eaux de surface marocaine, on a réalisé une enquête auprès de 100 agriculteurs à El Gara, province de Berrechid (Région Casablanca-Settat). Tous les agriculteurs consultés utilisent les engrais et les pesticides. 75% des interviewés ignorent le mode d'emploi de ces produits. Les pesticides sont utilisés une fois par an par 44% des agriculteurs, 70% les appliquent par l'intermédiaire de pick up ou de tracteur, 3% les manipulent en mettant des habits spéciaux et 27% le font à mains nues [107].

Chapitre 3 : Apport des analyses toxicologiques dans les intoxications aux pesticides chez l'être humain

1 Aperçu général

1.1 L'identification et le criblage toxicologique

1.1.1 Identification toxicologique

L'identification chimique est d'attribuer un analyte sous forme de signale à un composé chimique connu ou à un groupe de composés [113].

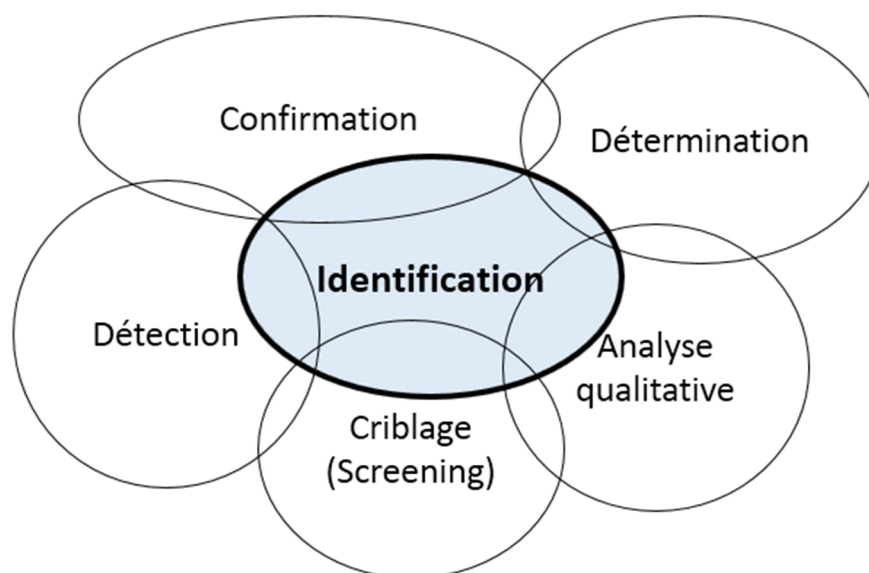


Figure 6: Représentation de la terminologie en relation avec l'identification

- La détermination concerne l'aspect qualitatif et quantitatif de l'analyse chimique.
- Le screening est une analyse chimique rapide qui donne que des résultats préliminaires. Une confirmation est toujours nécessaire.
- La détection veut dire que le signal a été reçu.

Un processus analytique est considéré comme un générateur d'information. Ceci dit, une identification demande un assemblage d'un maximum d'information sur le composé. La complexité de la molécule augmente le nombre de la diversité des atomes, des bonds, des configurations et confirmations moléculaires. Par conséquent, la quantité des informations

nécessaires pour une description des molécules complexes a augmenté. Ceci est montré dans le tableau 6. En effet, la spectrométrie puis la spectrométrie de masse et la chromatographie sont les meilleures techniques classées.

Tableau 6: La quantité d'information générée par les différentes techniques

Techniques	Le potentiel d'information en Bits
Analyse d'émission spectrale	$\leq 2\ 000\ 000$
Spectrométrie de rayon X	$\leq 50\ 000$
Chromatographie gazeuse	8000
Spectrométrie UV visible	≤ 1000
Spectrométrie IR	$\approx 10\ 000$
Spectrométrie de masse	≈ 2000000

Aujourd'hui, plusieurs analystes montrent que les méthodes de screening et de confirmation sont plus « fiables » que celles d'auparavant.

Les méthodes de screening sont les méthodes utilisées pour détecter la présence d'une substance ou une classe de substances selon l'intérêt ou la finalité de l'analyse. Ces méthodes sont spécialement faites pour éviter les résultats faux positifs.

Les méthodes de confirmation sont les méthodes qui procurent des informations complètes ou complémentaires permettant l'identification précise ou la quantification de la substance d'intérêt. Ces méthodes sont généralement basées sur la spectrométrie de masse et demande une grande qualité métrologique.

Pour les analyses organiques faites par la chromatographie et la spectrométrie de masse, la plupart des échantillons ne peuvent être directement analysés.

1-La phase de l'échantillon ou la forme de l'analyte n'est pas compatible avec la technique analytique.

2-Des composés dans l'échantillon ou la matrice elle-même interfèrent avec le composé recherché.

3-Les molécules cibles ont une très faible ou très grande quantité.

Cependant les échantillons doivent être traités avant l'analyse. Le choix de méthode de traitement dépend de la nature de l'échantillon [113].

Les unités physiques dans les procédures d'identification par spectrométrie et par chromatographie sont : la longueur d'onde, la fréquence les masse et le temps.

La deuxième dimension du spectre ou du chromatogramme est l'intensité du signal (signal/pic).

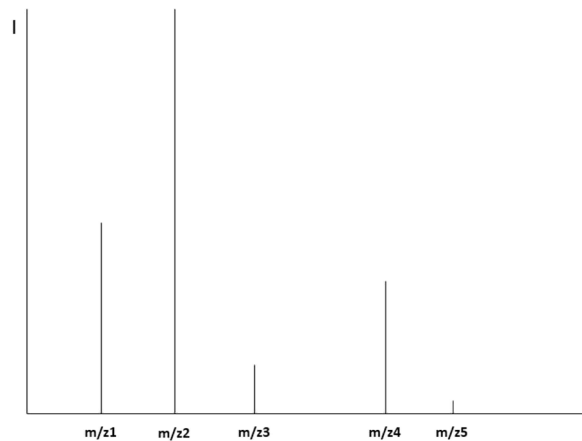


Figure 7: Un spectre de masse typique

1.1.2 Criblage toxicologique ou Screening

Le screening, appelé aussi criblage toxicologique, est une approche analytique qui associe un chromatographe, un détecteur et un système informatique de traitement des données. L'échantillon est séparé par la chromatographie en se basant sur des interactions physicochimiques entre les composés de l'échantillon, la phase stationnaire (la colonne) et la phase mobile (gaz ou solvant) qui fait traverser l'échantillon dans la colonne. Un signal est généré par le détecteur sous forme de spectre (Figure 8).

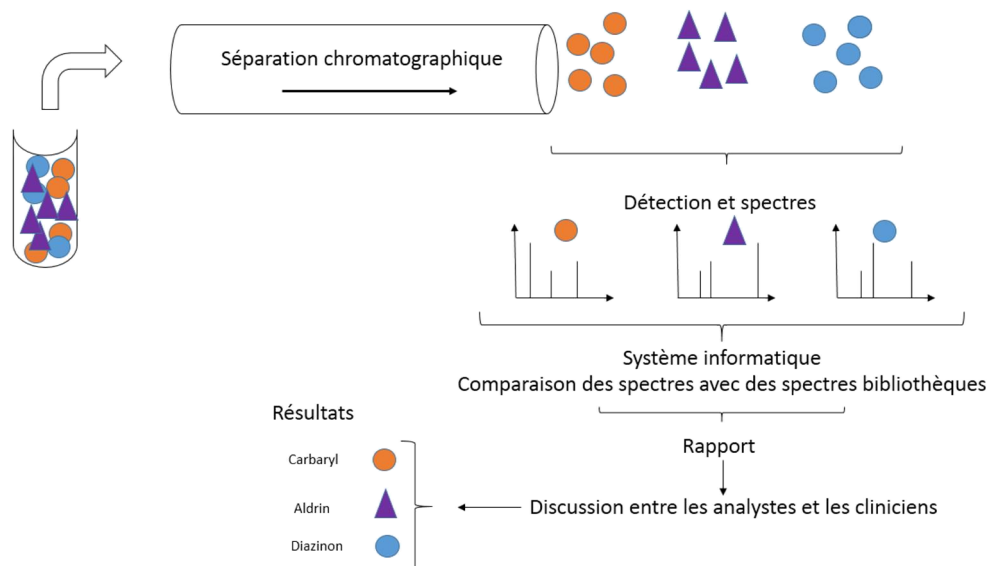


Figure 8 : Processus du criblage toxicologique

Souvent, le screening fait appel à la chromatographie gazeuse (GC) ou liquide (LC). La GC s'utilise pour les pesticides volatiles sin non une étape de dérivation est souhaitée. Pour le criblage toxicologique, la seule détection des composés en sortie de colonne n'est pas suffisante

pour leur identification. C'est pourquoi, on associe soit un détecteur de type spectromètre de masse à la CG et la CL (CG/SM, CL/SM), soit un détecteur ultraviolet, (souvent à barrettes de diodes), pour la CL (CL/BD).

Les résultats obtenus sont ensuite comparés à l'aide des logiciels avec la bibliothèque spectrale présente. Elle peut contenir jusqu'à 3000 molécules (pesticides, médicaments, etc...).

La technologie de la spectrométrie de masse en tandem a révolutionné la toxicologie analytique. Cela a pu augmenter la spécificité et la sensibilité des appareils. Une analyse ou bien un criblage toxicologique peut être réalisé en deux heures, c'est-à-dire que cela permet d'avoir des résultats rapides. Le screening peut parfaitement dépasser l'identification des molécules jusqu'à l'étape du dosage.

Le screening demande un grand investissement que ça soit au niveau du matériel ou des compétences [114].

Généralement les centres hospitalisés doivent disposer de ces équipements pour pouvoir réaliser les examens analytiques nécessaires. Au Maroc, il existe un nombre considérable de centre qui disposent de chromatographie quoi que cela ne soit pas suffisant.

On peut aussi parler de l'identification non ciblée, c'est une identification qualitative d'un analyte inconnu. Cette opération peut répondre à la question sur quel est le composé présent dans l'échantillon et quelle est sa nature [113].

Il existe plusieurs molécules connues par les scientifiques mais il est à considérer que plusieurs se ressemblent dans les structures et les propriétés. Ceci peut induire à avoir des résultats faux positifs. L'utilisation d'une variété de méthodes analytiques à remédier à cette contrainte. Ceci est opérationnel dans le domaine de la toxicologie et l'approche la plus utilisée est la chromatographie et la spectrométrie de masse.

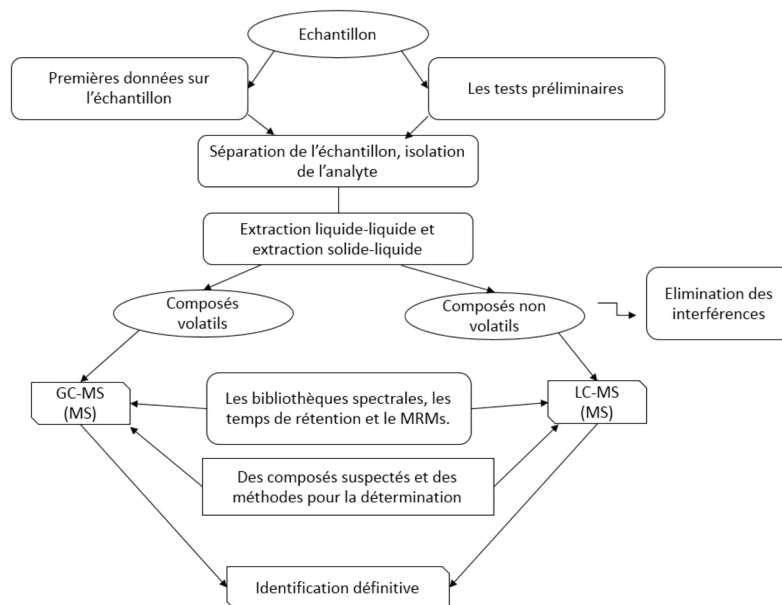


Figure 9: Schéma du processus analytique subi par l'échantillon

2 Etapes analytiques des méthodes d'identification des pesticides dans les matrices biologiques

L'évolution de l'instrumentation permet maintenant de réaliser des séparations chromatographiques rapides et efficaces couplées à une détection par spectrométrie de masse performante pour une analyse spécifique et sensible. Pourtant, la complexité des échantillons à traiter tels que les fluides biologiques (sang, plasma, urine...) conduit très souvent à des phénomènes de suppressions d'ions lors de la détection, ce qui diminue considérablement la sensibilité du dosage. A part l'utilisation d'étalons internes, qui est souvent coûteuse dans le cas d'étalons deutérés, l'amélioration des performances est faite à l'aide de purification dans l'étape de traitement de l'échantillon pour réduire ces phénomènes [115].

Les pesticides ou leurs métabolites ne sont pas directement dosables dans les matrices biologiques, mises à part quelques rares méthodes immunochimiques [116]. En général les méthodes se déroulent en trois étapes : le préanalytique, l'analytique et le post analytique [117].

2.1 Préanalytique: avant l'analyse instrumentale

Pour toutes les méthodes analytiques, il est recommandé de chercher à simplifier, miniaturiser et assurer l'efficacité de l'extraction de telle façon à optimiser le temps et le coût.

Cette pré concentration et purification est d'autant plus importante dans le cas des faibles concentrations [115]

Il existe plusieurs méthodes d'extraction qui aide à simplifier et à purifier l'échantillon avant l'analyse instrumentale.

L'extraction liquide/liquide (LLE) est largement utilisée dans les méthodes de screening (criblage) de pesticides dans les matrices biologiques. Toutefois, l'extraction sur support solide (SPE) et la micro-extraction sur support solide (SPME) permettent d'éviter notamment la formation d'émulsions souvent observées en LLE. Par ailleurs, les propriétés physico-chimiques des supports polymériques ont largement amélioré la rétention et la purification des analytes, mais aussi la simplification des procédures d'extraction. Ainsi, la SPME développée par Pawliszyn permet de réaliser l'extraction dans les matrices biologiques, la concentration et l'injection en une seule étape. En toxicologie d'urgence, la SPME présente l'avantage d'être rapide, mais elle est peu sensible ; la LLE est peu onéreuse, cependant elle demande plus de temps de manipulation ; enfin la SPE a l'avantage d'être sensible et automatisable, mais elle est d'un coût plus élevé. Les méthodes publiées sont en général complexes : les méthodes d'extraction sont longues et une étape de dérivation est souvent nécessaire. Elles ne sont donc pas applicables dans des cas d'intoxications en urgence . Il existe également d'autres techniques de micro-extraction en phase liquide qui améliorent à la fois la sensibilité et la qualité de l'analyse et qui sont décrites dans une revue générale signée de Lambropoulou et Albanis[118].

2.1.1 Méthode d'extraction

La méthode d'extraction est une étape essentielle et décisive avant toute identification chromatographique

2.1.1.1 Extraction liquide-liquide

C'est une opération fondamentale de transfert de matière entre deux phases liquides non miscibles, sans transfert de chaleur.

Cette opération est fréquemment utilisée pour séparer à partir d'un mélange liquide des constituants dont les volatilités sont faibles ou très voisines, ou qui donnent des azéotropes, ou encore qui sont thermo-dégradables. La séparation des phases s'obtient par décantation gravimétrique ou centrifuge.

Pour que l'opération soit réalisable il est nécessaire que :

- Les deux phases ne soient pas complètement miscibles
- Leur masse volumique soit différente
- Il n'existe pas de réactions chimiques entre les divers constituants du mélange.

Le passage du soluté dans le solvant aboutit théoriquement à un équilibre dans la composition des phases. L'obtention de cet équilibre est liée à la vitesse de diffusion du soluté d'une phase à l'autre.

Les vitesses d'extraction sont d'autant plus grandes que les différences de concentration en soluté des deux phases en contact sont grandes, et que la surface d'échange entre les deux phases est grande. L'agitation du milieu a pour effet d'augmenter la surface de contact entre les phases et de favoriser la diffusion du soluté au sein de chaque phase.

On obtient ainsi une phase riche en soluté qu'on appelle « extrait » et une phase pauvre en soluté appelée « raffinat ».

Le transfert du soluté du raffinat au sein de l'extrait, d'après le processus exposé ci-dessus, devrait aboutir théoriquement, à température et à pression constantes, à un état stationnaire, correspondant à l'équilibre du soluté entre les deux phases liquides. Cet état d'équilibre est l'état idéal. Cet état idéalité est très rarement atteint dans la pratique, ce qui oblige à définir une efficacité ou rendement pour utiliser industriellement les résultats des calculs théoriques.

$$\text{Rendement} = \frac{(\text{n du soluté initial} - \text{n du soluté extrait})}{\text{n du soluté initial}} \times 100$$

2.1.1.2 Extraction sur phase solide

L'extraction sur phase solide ou Solid Phase Extraction (SPE), introduite pour la première fois au milieu des années 1970, est la technique la plus répandue actuellement lors de l'analyse de traces dans des échantillons liquides [37].

Elle constitue un outil puissant et nécessaire pour le développement de méthodes d'analyse de polluants organiques à très faible concentration dans l'eau. Depuis son introduction dans les protocoles de prétraitement de l'échantillon, cette méthode a subi beaucoup des modifications et d'adaptation en fonction de la nature des analytes à extraire et en fonction des objectifs à atteindre.

Le principe de la SPE repose sur la distribution des composés à extraire entre une phase liquide, l'échantillon, et une phase solide, l'adsorbant. Cette distribution est gouvernée par des mécanismes de rétention basés sur les différences d'interactions moléculaires entre l'analyte, le site actif de l'adsorbant et la phase liquide. Divers formats sont disponibles lors de l'application de la SPE ; le plus couramment employé est le format de la cartouche où l'adsorbant est emprisonné entre deux frittés.

En général, le protocole d'extraction sur une cartouche SPE comporte au moins quatre étapes.

La première étape de conditionnement a pour objectif de mouiller et d'activer les groupements fonctionnels présents à la surface de l'adsorbant dans le but de préparer le support au passage de

l'échantillon. La seconde étape consiste à percoler l'échantillon contenant les solutés à extraire à travers la cartouche SPE en appliquant par vide en sortie de la cartouche. Durant cette étape, si l'adsorbant greffé est bien sélectionné, les molécules cibles présentant une forte affinité pour le support solide y sont fixées, tandis que les interférents n'ayant aucune affinité pour la phase solide traverseront la colonne avec l'éluant et ne sont pas retenus.

L'extraction sur phase solide (SPE) se déroule en quatre étapes : le conditionnement de la phase stationnaire, le dépôt de l'échantillon, le lavage-élimination de substances endogènes puis l'éluion qui permet de récupérer la/les substance(s) d'intérêt [119]. Des méthodes d'extraction en ligne sont également disponibles, permettant par exemple un couplage direct SPE-appareil de chromatographie. La microextraction sur fibres (solid-phase micro-extraction, SPME) est une autre méthode simple, rapide dont les premiers développements ont concerné la recherche de substances volatiles (solvants, molécules de faible masse molaire) par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

Les composés organiques sont le plus souvent extraits de l'air surnageant l'échantillon, après chauffage de celui-ci, par une fibre de silice enrobée d'un polymère puis directement transférés dans l'injecteur. L'analyse de type « head space » est souvent utilisée pour cette approche des molécules « légères » par transfert direct de l'air surnageant dans l'échantillon vers le CPG mais nécessite un matériel plus sophistiqué.

Lors de toute préparation d'échantillon, il est nécessaire de prendre en compte les données physico-chimiques des molécules qui déterminent les conditions optimales de l'extraction (extraction en milieu basique ou acide, solubilité dans les solvants...), leur stabilité. La qualité de la séparation chromatographique (liquide ou gazeuse) permet d'assurer une spécificité analytique qui est renforcée par la spécificité des systèmes de détection envisagés.

Les types de détection disponibles sont essentiellement la spectrométrie UV-visible avec système à barrette de diodes[120], la spectrométrie de masse ou spectrométrie de masse en tandem. L'interprétation se fait par comparaison du temps de rétention et du spectre avec une bibliothèque de spectres connus. La spectrométrie de masse en tandem permet d'identifier puis de quantifier les molécules avec une très bonne spécificité mais il est recommandé de sélectionner au moins deux transitions ioniques (ion parent-ions fils). La disponibilité récente des appareils de mesure en « masse exacte » (de type TOF ou Orbitrap...) permet une spécificité quasi absolue d'identification des composés. En effet, elle permet de distinguer des masses avec une précision de 4 chiffres après la virgule, comme cela est le cas pour les différents métabolites de l'alimémazine [121]. Le

cas des nouvelles drogues de synthèse disponibles sur internet soulève une difficulté nouvelle et supplémentaire car, le plus souvent, elles ne figurent pas dans les bibliothèques.

Dans ce cas, il est nécessaire de récupérer des substances pures afin de confirmer l'identité de la molécule.

2.2 Analytique

Il s'agit de l'analyse instrumentale proprement dit. De très nombreuses techniques analytiques sont proposées aujourd'hui pour l'analyse des pesticides et/ou leurs métabolites dans les milieux biologiques. Après traitement de l'échantillon, le plus souvent par extraction, l'analyse instrumentale fait appel aux méthodes chromatographiques classiques comme la chromatographie en couche mince (CCM), la chromatographie en phase gazeuse (GC) ou la chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplées toutes deux à la spectrométrie de masse simple (MS) ou en tandem (MS/MS). Certaines méthodes permettent la caractérisation de plusieurs pesticides appartenant à des familles différentes, mais elles restent rares. La plupart des techniques se limitent à doser un groupe donné de pesticides dans des conditions expérimentales bien précises. Les concentrations toxiques sont très variables d'un composé à l'autre et justifient la recherche d'une limite de quantification (LOQ) parfois très faible.

Aujourd'hui, aucune méthode n'est dite universelle pour doser les pesticides, dans le sang par exemple, parce que la mise en évidence de ces molécules demande des techniques sophistiquées et des techniciens expérimentés [117].

De nombreuses techniques, de plus en plus performantes, existent, mais les possibilités d'identification et de quantification de chaque toxique vont dépendre des méthodes disponibles dans le laboratoire de toxicologie. Actuellement, nous avons deux types d'analyses : le dépistage (résultats qualitatifs ou semi-quantitatifs) et le dosage (résultats quantitatifs). Le « screening » toxicologique associe généralement plusieurs méthodes de dépistage et de dosage.

La méthode qui permet de tout détecter, rapidement et avec un faible coût n'existe pas encore.

2.2.1 Méthodes d'analyse

De très nombreuses techniques analytiques sont proposées aujourd'hui pour l'analyse des pesticides et/ou leurs métabolites dans les milieux biologiques. Après traitement de l'échantillon, le plus souvent par extraction, l'analyse instrumentale proprement dite fait appel aux méthodes chromatographiques classiques comme la chromatographie en couche mince (CCM), la chromatographie en phase gazeuse (GC) ou la chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplées toutes deux à la spectrométrie de masse simple (MS) ou en tandem (MS/MS).

Certaines méthodes permettent la caractérisation de plusieurs pesticides appartenant à des familles différentes, mais elles restent rares.

La plupart des techniques se limitent à doser un groupe donné de pesticides dans des conditions expérimentales bien précises. La mise en évidence des pesticides dans le sang requiert des techniques sophistiquées nécessitant un matériel souvent onéreux et des techniciens expérimentés. Les concentrations toxiques sont très variables d'un composé à l'autre et justifient la recherche d'une limite de quantification (LOQ) parfois très faible. Il n'existe pas aujourd'hui de méthode universelle de dosage des pesticides dans le sang [117].

Le choix d'une technique parmi ces méthodes pour l'analyse d'un mélange des OCs dans le sang s'est porté sur (CPG/SM) [49]. Cette technique est un outil analytique qualitatif et quantitatif, très sensible et fiable.

2.2.1.1 La chromatographie

La première apparition de la chromatographie était à la fin du 18^{ème} siècle par le savant Michel Tswett qui travaillait sur l'extraction de la chlorophylle avec de l'éthanol dans les plantes vertes. Mais il remarquait qu'il reste d'autre pigment non retenu lors de son extraction. A ce stade il essaye d'approfondir ses travaux en utilisant plusieurs types de plante avec l'éther de pétrole. Par le rinçage avec différents solvants, il arrive à recueillir certains composants sur les colonnes. Ce qui donnera naissance à la méthode chromatographique suite à sa publication en 1906 [122].

La chromatographie est utilisée comme méthode de séparation des composants présents dans des mélanges ou des mélanges. En analyse, c'est la méthode idéale pour l'identification et la quantification des constituants présents dans un échantillon déterminé. Le principe de base repose sur les équilibres de concentration qui apparaissent lorsqu'un composé est mis en présence de deux phases non miscibles. La première est dite stationnaire. Elle est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support. La deuxième est la phase mobile. Elle se déplace au contact de la première.

Les composés présents dans l'échantillon sont entraînés à des vitesses distinctes et ainsi séparés. Ce procédé hydrodynamique physico-chimique de séparation a permis à cette méthode analytique instrumentale d'élargir son application surtout dans les laboratoires d'analyse moléculaire.

L'expérience de base en chromatographie peut se faire en trois étapes :

1. Un solide est immobilisé dans une colonne finement divisé (phase stationnaire).
2. Un volume de l'échantillon à séparer est mis en place au sommet de la colonne.

3. Au moyen de la phase mobile, l'échantillon est forcé à traverser la colonne de haut en bas afin d'entraîner ses divers constituants. Si les composés présents migrent à des vitesses différentes, ils pourront être recueillis séparément, chacun en solution dans la phase mobile.

Ce but initial de séparer les échantillons s'est ensuite convergé vers l'identification de ces molécules par la mesure du temps de migration. Il était donc nécessaire de prendre en considération plusieurs paramètres, à savoir : le débit, la température...etc. de plus, le besoin d'un détecteur est important pour le suivi des changements subies lors du passage dans la colonne.

L'identification d'un composé par chromatographie est une comparaison entre les temps de migration du composé de référence et du composé trouvé dans l'échantillon analysé, tout en opérant dans les mêmes conditions expérimentales. Cette séparation donne lieu à un chromatogramme qui trace toutes les variations des concentrations du soluté subies au cours du temps dans la colonne.

Un constituant est caractérisé par son temps de rétention t_R , qui représente le temps écoulé entre l'instant de l'injection et celui qui correspond sur le chromatogramme au maximum du pic qui lui est lié. Dans le cas idéal t_R est indépendant de la quantité injectée.

Un constituant non retenu sort de la colonne au temps t_M , appelé temps mort (ou bien t_0).

La différence entre le temps de rétention et le temps mort est désignée par le temps de rétention réduit du composé T_R . En analyse quantitative on se contente le plus souvent de bien séparer du mélange le ou les constituants à doser. Si le signal envoyé par le capteur varie linéairement avec la concentration d'un composé, il en sera de même de l'aire du pic correspondant sur le chromatogramme.

2.2.1.2 Spectromètre de masse

La spectrométrie de masse est composée principalement ; d'un ionisateur, d'un détecteur, d'un analyseur de masse et un signal sous forme de spectre de masse.

On distingue la performance d'un spectre de masse par ; sa résolution, son exactitude, sa sensibilité et son domaine de masse.

Pour une meilleure séparation des composés, la spectrométrie de masse est couplée à la chromatographie.

Pour comprendre le mécanisme de fonctionnement des parties composantes, des descriptions sont proposées ici :

L'ionisateur sert à produire des ions positifs ou négatifs. Les principales sources ioniques dépendent de l'échantillon à analyser.

L'analyseur de masse sert à séparer les ions collectés soit sous l'action d'un champ électrique, soit sous l'action d'un champ magnétique. Il peut être couplé avec presque tous les ionisateurs. Les analyseurs de masse se différencient par leur résolution et leur domaine de masse d'analyse.

Le détecteur sert à mesurer le nombre d'électrons et à amplifier le signal pour atteindre une bonne sensibilité. Le plus utilisé est un multiplicateur d'électrons. Ensuite le signal est enregistré et un spectre de masse est produit.

Le spectre de masse représente en ordonnée l'abondance des pics (en %) et en abscisse les rapports de masse sur charge (m/z)

L'identification de nos molécules est possible par interrogation et comparaison de nos données (provenant du spectre de masse) sur une base de données contenant une banque de spectre. Le résultat obtenu sera un résultat statistique de probabilité (en %) d'identification de notre molécule [123].

2.2.1.2.1 La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

La chromatographie en phase gazeuse (GC) est une technique largement utilisée dans de nombreuses branches de la science et de la technologie. Pendant plus d'un demi-siècle, le GC a joué un rôle fondamental dans la détermination du nombre de composants et de leur proportion dans un mélange. Cependant, la capacité d'établir la nature et la structure chimique de ces composés séparés et quantifiés est ambiguë et réduite et nécessite un système de détection spectroscopique. Le plus utilisé est le détecteur de spectrométrie de masse (MSD), qui permet d'obtenir l'empreinte digitale de la molécule, c'est-à-dire son spectre de masse. Les spectres de masse fournissent des informations sur le poids moléculaire, la composition élémentaire, si l'on utilise un spectromètre de masse à haute résolution, des groupes fonctionnels présents et, dans un système de chromatographie en phase gazeuse, l'échantillon à analyser peut être une solution liquide ou une collection de molécules adsorbées sur une surface, par exemple le système de microextraction en phase solide (SPME). Lors du transfert dans le GC, l'échantillon est volatilisé par exposition rapide à une zone maintenue à une température relativement élevée (200-300 ° C) et mélangé à un courant de gaz porteur (Ar, He, N₂ ou H₂). Le mélange gazeux résultant entre dans la section de séparation, une colonne chromatographique, qui dans sa version courante est un capillaire tubulaire de silice fondue revêtu intérieurement d'un mince film polymère. Lors de leur déplacement à travers la colonne, les molécules d'analyte sont partagées entre le courant porteur de gaz (phase mobile) et le revêtement polymère (phase stationnaire), dans une mesure qui dépend principalement de leur structure chimique. A la fin de la section de séparation, les molécules atteignent un système de détection dans lequel une propriété physique spécifique (conductivité

thermique) ou un processus physico-chimique (ionisation dans une flamme, capture d'électrons) donne lieu à un signal électrique proportionnel à la quantité de molécules de la même identité.

Un système de données permet de traiter ces données pour produire un graphique de la variation de ce signal de détecteur avec le temps (chromatogramme). Ainsi, quatre sections principales se distinguent dans le chromatographe: introduction (injecteur), séparation (colonne chromatographique), détection et unités de traitement des données. Chaque section a sa propre fonction et sa responsabilité pour la qualité de l'analyse et les résultats obtenus. Le système d'injection, par exemple, devrait idéalement transférer l'échantillon sur la colonne quantitativement, sans discrimination sur les poids moléculaires ou la volatilité, et sans altération chimique (décomposition ou isomérisation). C'est une étape critique, surtout pour l'analyse quantitative. Pour un bon fonctionnement du GC, entre autres conditions, cette passerelle vers la colonne doit rester non polluée, propre, inerte et sans fuite.

La principale exigence pour un analyte dans GC est qu'il doit être suffisamment volatil pour être présent en quantités détectables dans la phase mobile. Les substances à faible pression de vapeur ne pénètrent pas dans la colonne chromatographique, s'accumulent au niveau du système d'injection et peuvent finalement boucher ses conduits. Les composés très polaires, thermolabiles, ioniques et à haut poids moléculaire ne sont pas compatibles avec l'analyse GC classique. En fonction de la structure moléculaire de l'analyte et des groupes fonctionnels disponibles, il est possible dans certains cas d'obtenir un dérivé chimique qui présente une pression de vapeur plus élevée et qui est donc plus sensible à l'analyse GC.

Une des caractéristiques les plus importantes de la colonne chromatographique est sa résolution, ou la capacité de séparer des composants avec des constantes de distribution très proches entre les phases mobile et stationnaire (K_D). La résolution chromatographique est une fonction de nombreux paramètres opérationnels. Parmi eux, la nature de la phase stationnaire, de la phase mobile, de la température, de la taille de la colonne, c'est-à-dire de sa longueur (L), du diamètre intérieur (ID) et de l'épaisseur de la phase stationnaire (d_f). Comme le nombre de composants dans le mélange augmente, et la similarité structurale entre ses composants se développe (isomérisation), des colonnes plus longues sont nécessaires pour la séparation complète des composés. En variante, dans le même but, on peut employer des colonnes de plus petit diamètre intérieur. Évidemment, l'augmentation de la longueur de la colonne augmente nettement le temps d'analyse. Ainsi, l'analyse des hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP) ou des médicaments contrôlés s'effectuant régulièrement au moyen de colonnes de 30 m de long, la séparation des hydrocarbures dans l'essence nécessite des colonnes de plus de 100 m.

Pour les screenings larges, et pour une complémentarité de l'analyse chromatographique une combinaison de chromatographie couplée à la spectrométrie (GC-MS) de masse est utilisée. Une analyse GC-MS fournit des informations sur les temps de rétention, les zones chromatographiques et les spectres de masse de chaque composant dans un mélange, obtenu par ionisation à impact électronique (EI) à 70 eV. La valeur de 70 eV a été obtenue comme standard pour obtenir la MS, qui fait également partie des bases de données et des bibliothèques spectrales commerciales, car pour la plupart des composés organiques, l'efficacité d'ionisation et la reproductibilité sont les plus élevées en bombardant des électrons de cette énergie.

La technique couplée GC-MS est la combinaison en tandem la plus utilisée dans la chimie analytique instrumentale et est appliquée à des enquêtes sur des produits légaux, environnementaux, naturels, des aliments, des saveurs et bien d'autres domaines.

2.2.1.2.2 La chromatographie en phase liquide

La chromatographie en phase liquide (CPL) est une technique de séparation des constituants d'un mélange en solution basée sur le partage des composés entre une phase mobile dans laquelle ils sont solubles et une phase, dite fixe ou stationnaire, qui exerce sur eux un effet retardateur. Ainsi, la séparation des composés repose sur les différences d'affinité et d'interactions d'un composé pour la phase mobile et la phase stationnaire. Cette dernière peut varier en fonction des interactions existantes. Ainsi, selon les phénomènes mis en jeu lors de la séparation, différents types de chromatographie existent : l'adsorption, le partage, l'échange d'ions, la paire d'ions, l'échange de ligands, le transfert de charge et l'exclusion stérique.

La CPL à polarité de phase inverse (RP) avec un gradient d'élution est la stratégie la plus utilisée pour l'analyse des résidus de pesticides. Permettant d'une part l'analyse de composés avec différentes propriétés physico-chimiques et d'autre part, ces composés sont séparés selon leur différence d'hydrophobie par partage entre la phase stationnaire et la phase mobile. Celle-ci est composée d'une phase aqueuse (eau en général) et d'une phase organique (méthanol ou acétonitrile).

Quant aux phases stationnaires, elles sont à base de silice (modifiées par greffage de chaîne alkyleoctyl C8 ou octadecyl C18). Sont utilisés aussi des groupements aminopropyl, cyanopropyl ou phényl. D'autres phases apolaires à base de polymères (par exemple le copolymère styrène divinylbenzène) sont citées.

Ainsi, depuis son introduction au cours des années 1980, la CPL couplée à des détecteurs de type ultraviolet (UV) ou fluorescence a été adoptée comme une technique complémentaire à la CPG dans le domaine de l'analyse de résidus de pesticides.

De part sa large gamme d'application, sa stabilité à long terme, sa facilité d'utilisation, son faible coût et l'amélioration de la sélectivité grâce au détecteur à barrettes de diode (Diode Array, Detector, DAD), la détection UV a été longtemps la plus utilisée dans l'analyse de résidus de pesticides. Cependant, l'identification de pesticides dans des échantillons complexes peut être un problème pour la CPL couplée à des détecteurs conventionnels comme l'UV. Ces techniques ne sont pas suffisamment spécifiques, manquent de sélectivité (ressemblance des spectres UV de pesticides de même famille chimique) et de sensibilité pour l'analyse de traces de résidus dans des matrices complexes.

La détection par fluorescence est plus sensible et sélective, que l'absorption UV mais n'est applicable que pour les pesticides possédant des fluorophores. Le manque de détecteur performant et universel, applicable à une importante variété de composés et associé à la CPL a été surmonté avec le couplage à la détection par SM.

L'intérêt de ce couplage demeure dans la combinaison d'une part du pouvoir de séparation de la CPL et d'autre part du pouvoir d'identification et de confirmation des composés par SM.

Ainsi, associées à la SM, la CPL et la CPG restent deux techniques séparatives très complémentaires dans le domaine de l'analyse de pesticides [124].

2.3 Post-analytique

Le traitement des données et l'interprétation des résultats est une étape importante qui dépend essentiellement des étapes du prétraitement et de l'analyse instrumentale.

Généralement, le traitement des données peut être numérique ou avec des calculs statistique. La plus part des méthodes analytiques de séparation utilisent des logiciels dédiés à cette finalité.

Chapitre 4 : Validation et optimisation des méthodes d'analyse

On considère que la validation des méthodes analytiques demeure une exigence dans le système de management de la qualité.

Le laboratoire de toxicologie doit valider les méthodes d'analyse non normalisées, les méthodes d'analyse développées par le laboratoire de toxicologie, les méthodes d'analyse normalisées employées en dehors du domaine d'application prévu et les méthodes d'analyse normalisées modifiées par le laboratoire de toxicologie, afin de confirmer que les méthodes d'analyse sont assez performantes pour l'emploi prévu.

La validation d'une méthode devra s'envisager en fonction des différents contextes auxquels sera confronté le biologiste ou le responsable technique. "La validation est toujours un équilibre entre les coûts, les risques et les possibilités techniques" [125] et le temps. On entend par validation, "[...] la confirmation par examen et apport de preuves objectives du fait-que les prescriptions particulières en vue d'une utilisation déterminée sont remplies. ».

Le laboratoire doit utiliser des procédures analytiques, incluant celle de sélection et d'aliquotage d'échantillons, qui correspondent aux besoins des utilisateurs des prestations de laboratoire et qui conviennent à chaque type d'analyse. Les procédures analytiques conseillées sont celles qui ont été publiées dans des manuels bien établis et faisant autorité, dans des textes et des journaux revus par des experts ou des recommandations régionales, nationales ou internationales. Si des procédures internes sont utilisées, elles doivent être validées de manière appropriée pour l'utilisation prévue et parfaitement documentées [125].

Le laboratoire doit utiliser uniquement des procédures validées pour s'assurer qu'elles conviennent à l'utilisation prévue. Les validations doivent être aussi approfondies que nécessaires pour répondre aux besoins de l'application ou du domaine d'application concerné(e). Le laboratoire doit enregistrer les résultats obtenus et la procédure utilisée pour la validation.

1 Les méthodes d'analyse pour la validation

Les méthodes et les procédures sélectionnées doivent être évaluées et donner des résultats satisfaisants avant d'être utilisées pour les analyses médicales. Une revue des procédures par

le directeur du laboratoire ou une personne désignée doit être réalisée à l'origine à intervalles définis. Ces revues sont généralement effectuées une fois par an [126].

On pourrait parler de types de validation selon le type d'analyses à faire. On distinguera trois types de méthodes d'analyse.

1.1 Les analyses de type quantitatif

Elles fournissent un résultat chiffré, sur une échelle continue dont les limites basses et hautes sont connues, en relation directe avec une quantité ou une activité donnée de l'analyte à mesurer. Ex : Dosage de médicaments dans le cadre du Suivi Thérapeutique Pharmacologique et dosage d'autres xénobiotiques en Toxicologie. Analyses réalisées par méthodes immunologiques et/ou chromatographiques.

1.2 Les analyses de type qualitatif

Le résultat de ce type d'analyse n'apporte pas d'information sur la quantité de l'analyte, mais seulement sur sa présence ou sa non détection (positif ou non détecté). Ex : Dépistage de xénobiotiques par méthodes chromatographiques. Les pics des chromatogrammes obtenus sont identifiés par les temps de rétention et par les spectres UV et/ou de masse. Ils peuvent être comparés à une bibliothèque prédéfinie de spectres.

1.3 Les analyses assimilables à des analyses quantitatives

Dans ce cadre seront regroupées des analyses fournissant un résultat de type qualitatif, extrapolé à partir de la mesure d'une donnée quantifiable (Absorbance par exemple) avec un effet de seuil.

Ex : En Toxicologie, détermination d'une classe de molécules médicamenteuses (benzodiazépines, antidépresseurs tricycliques ...), ou de substances illicites (amphétamines, opiacés, cannabinoïdes, cocaïniques ...) avec des seuils prédéfinis. En Suivi Thérapeutique Pharmacologique (observance du traitement), mesure d'une molécule ciblée (méthadone, buprénorphine ...). Les analyses sont réalisées selon le principe d'immunocompétition (EMIT, ELISA, CEDIA...).

Le tableau suivant spécifie les paramètres à étudier pour une validation selon le type[127].

La validation de la méthode est un processus qui démontre que la méthode satisfait ou dépasse avec succès les normes minimales recommandées dans la directive sur la précision et la sélectivité, la sensibilité, la reproductibilité et la stabilité de la Food and Drug Administration (FDA) [128].

Tableau 7: Les paramètres à étudier selon le type d'analyse

Méthode quantitative	Méthode qualitative	Méthode assimilable ou quantitatif
Spécificité	Spécificité	Spécificité
Fidélité	NA	Fidélité
Justesse	NA	NA
Domaine d'analyse	NA	NA
Limite de détection Limite de quantification	Limite de détection	Limite de détection
Linéarité	NA	NA
Contamination entre les échantillons (s'il y a lieu)	Contamination entre les échantillons (s'il y a lieu)	Contamination entre les échantillons (s'il y a lieu)
Stabilité	Stabilité	Stabilité
Robustesse	Robustesse	Robustesse
Interférences	Interférences	Interférences

*NA (non applicable),

2 Eléments principaux d'une validation

Pour valider une méthode on a besoin d'un de garantir une exactitude des résultats c'est-à-dire des résultats précis (fidèle) et juste. Il existe plusieurs paramètres à définir pour chaque méthode.

2.1 Fidélité

Ce paramètre comprend, la répétabilité, la répétabilité intermédiaire et la reproductibilité. Les essais de répétabilité et de fidélité intermédiaire sont obligatoires.

2.1.1 Répétabilité

L'essai de répétabilité consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon pour le même analyte dans des conditions identiques : même opérateur, même lots de réactifs, même instrument, même calibrateur.

En pratique, cet essai sera réalisé au cours d'une même série. Il est recommandé d'utiliser au moins deux niveaux de concentration. Les niveaux seront choisis en fonction des valeurs physiopathologiques et/ou de la réglementation.

Le nombre de déterminations dépendra du système analytique, du coût des réactifs. Cet effectif devra être ~ 6 . La valeur statistique des résultats obtenus dépend de ces effectifs.

L'exploitation des résultats consiste à calculer la moyenne (m), l'écart-type (s) et le coefficient de variation (CV) des valeurs expérimentales de chaque série.

Le CV représentera la répétabilité de la méthode en %. Il sera comparé au CV limite d'acceptabilité. Le calcul sera répété pour chacune des matrices (sérum, urine, et sang total en médico-légal, ...) soumises à analyse. Pour un même analyseur, ce calcul devra être effectué pour chaque analyte à mesurer.

2.1.2 Fidélité intermédiaire

L'essai de fidélité intermédiaire consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon pour le même analyte dans des conditions différentes : l'opérateur, les réactifs, l'appareillage, les calibrages et les gammes d'étalonnage, les jours peuvent être des données variables.

Il est recommandé d'utiliser au moins deux niveaux de concentration. 6 déterminations minimum sont nécessaires pour chacun des échantillons de validation. Les modalités de calcul sont identiques à celles de la répétabilité, avec calcul de la moyenne (m), de l'écart-type (s) et du coefficient de variation (CV) sur les valeurs expérimentales de chaque série ; le CV ainsi calculé sera comparé au CV limite d'acceptabilité.

2.2 Reproductibilité

L'essai de reproductibilité consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon dans différents laboratoires.

2.3 Justesse (biais)

En Toxicologie et Suivi Thérapeutique Pharmacologique, il n'existe pas, à de rares exceptions près, d'échantillons de contrôles raccordés sur le plan métrologique à des étalons internationaux ; il est donc impossible de parler de "valeur vraie" et par là-même de justesse. En l'absence de matériau de référence certifié, on pourra utiliser des échantillons utilisés pour des contrôles qualité et dont la commutabilité aura été vérifiée ou prouvée. Il est souhaitable (mais pas obligatoire) d'utiliser des échantillons de différentes origines commerciales. La justesse (biais) sera estimée en comparant la moyenne obtenue (m) lors de l'étude de répétabilité et/ou de fidélité intermédiaire à la valeur cible attendue assimilée à la valeur "vraie" (v) de l'échantillon testé.

Elle sera exprimée en pourcentage de la valeur cible, selon le calcul suivant ;

Justesse en % = $[(m-v)/v] \times 100$

Cette justesse pourra aussi être contrôlée à l'aide des valeurs de référence qui pourront être comparées à celles de la littérature.

2.4 Limite de détection et limite de quantification

2.4.1 Limite de détection

La limite de détection est le plus petit signal exprimé en quantité ou en concentration qui peut être distingué avec une probabilité donnée d'un blanc réalisé dans les meilleures conditions. C'est la quantité minimale détectable pour laquelle la réponse (en signal mesuré) peut être distinguée avec une probabilité donnée d'un blanc.

L'étude de la limite de détection est basée sur l'analyse statistique de la différence de signaux observés pour les blancs et les échantillons.

Méthode 1 : Pour l'estimer, on pourra effectuer 30 mesures répétées des blancs (matrice dépourvue de la substance à doser), dans une même série, et on calculera l'écart-type (s), exprimé en concentration, de ces 30 mesures.

La limite de détection peut être calculée selon la formule suivante :

Limite de détection = moyenne + 3 écarts-type

Méthode 2 : Une limite de détection peut être déterminée par excès et correspondre à la limite de quantification.

2.4.2 Limite de quantification

La limite de quantification correspond à la plus petite valeur exprimée en concentration, rendue avec une confiance acceptable. C'est la valeur pour laquelle le CV et l'écart à la valeur théorique sont inférieurs à la limite d'acceptabilité.

Méthode 1 : la limite de quantification peut être calculée à partir des mesures de blanc

Limite de quantification = moyenne + 10 écarts-type

Méthode 2 : Il est possible de réaliser des dilutions du calibrateur ou de l'échantillon de Contrôle de Qualité Interne le plus bas (différent de 0) avec le blanc échantillon, jusqu'à satisfaire la limite d'acceptabilité dans les mêmes conditions que les études de fidélité (n ~ 6) Pour déterminer la limite de quantification, on calculera, pour chaque série de mesures des différentes dilutions, l'écart-type (s), le Coefficient de Variation (CV) et l'écart de la moyenne (m) à la valeur théorique.

Limite de quantification = valeur pour laquelle le CV et l'écart à la valeur théorique sont inférieurs à la limite d'acceptabilité

2.5 Linéarité

A partir d'une solution mère d'analytes, des solutions de concentrations différentes seront préparées. Ces solutions permettront de vérifier la linéarité.

La linéarité d'un test est sa capacité (pour une gamme donnée) à produire des résultats proportionnels à la concentration de l'analyte et à être modélisée par une transformation mathématique. Le modèle mathématique peut éventuellement être une droite mais s'il est le plus facile à calculer, il s'agit rarement d'un modèle correctement descriptif.

Le nombre de points de gamme ne peut être inférieur à 5 et le nombre de mesures par point ne peut être inférieur à 3. Dans certains cas particuliers (si l'interprétation ne dépend pas strictement de la concentration), il peut être justifiable de restreindre encore le nombre de mesures.

2.6 Stabilité

Il est nécessaire de définir pour chaque type d'analyte, en fonction des spécifications techniques du fabricant ou de la connaissance de la molécule de référence, un délai de péremption a priori (1,3 ou 6 mois). A échéance du délai fixé, préparer une nouvelle solution dont les caractéristiques analytiques sont comparées à la solution arrivée à péremption, afin de confirmer ou de modifier le délai de péremption préalablement fixé.

Les critères d'acceptabilité de la validité des solutions de référence sont fixés par le laboratoire pour chaque type d'analyte.

*Partie 2 : Optimisation et validation analytique de
méthode d'identification de pesticides dans le plasma
humain*

Chapitre 1 : Optimisation de la détection de 15 molécules de pesticides par la LC-MS/MS

Les laboratoires d'analyse s'offrent de plus en plus un large choix d'outils d'analyse sophistiqués qui permettent un accès facile à la recherche et au dosage des toxiques [129], [130].

Ce travail vise à optimiser une méthode de dosage de quinze molécules de pesticide par chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse en tandem LC-MS/MS avec la méthode d'extraction QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe).

1 Méthodes et matériels

1.1 Méthode

Il s'agit d'une optimisation de la détection des molécules par LC-MS/MS en ionisation par électrospray (ESI), on obtient majoritairement des adduits protons dits « ions moléculaires » du type $[m+H]^+$. Le mode Single Ion Monitoring (SIM) permet quant à lui de ne filtrer qu'un seul rapport m/z sur un quadripôle.

Multiple Reaction Monitoring (MRM) est un mode de balayage qui fait fonctionner les quadripôles Q1 et Q3 en mode SIM. Un ion est sélectionné dans le premier quadripôle, fragmenté dans la cellule de collision, puis son ion fils le plus caractéristique (spécifique et intense) est sélectionné dans le troisième quadripôle. Chaque molécule est caractérisée par sa transition MRM, son temps de rétention (T_R), ses Potentiel de «déclusterisation» (DP), Potentiel d'entrée (EP), Potentiel d'entrée dans la cellule de collision (CEP), Energie de collision (CE), Potentiel de sortie de la cellule de collision (CXP).

Dans ce travail, les MRMs et les energies (EP, CEP, CE, et CXP) sont trouvées par injection manuelle dans le spectre de masse. Les T_{RS} sont obtenus par passage dans la colonne.

1.2 Matériels

1.2.1 Standard des pesticides

Le mélange des molécules est constitués de quinze molécules de pesticides ; Aldicarbe, carbaryl, carbofuran, chlorperiphos, cypermethrine, diazinon, deltamethrin,

diméthoate, fenitrothion, malathion, 3,5,6 trichloropyridol, methomyl, parathion, parathion méthyl, paraxon methyl.

1.2.2 Solvants

Méthanol (pour LC-MS/MS), Formate d'ammonium, Acide formique, Eau pour HPLC(H₂O)

1.2.3 Appareillages

Agitateur, Centrifugeuse, Sonificateur, LC-MS/MS

1.2.4 LC-MS/MS

Pour la recherche des pesticides, une LC-MS/MS sera utilisée (Linear ion Trap Quatrapole LC-MS/MS Mass spectromètre 3200Q TRAP- AB Sciex Instruments). Un temps d'analyse de 15 minutes a été choisi avec 10 microlitres comme volume d'injection.

La phase aqueuse est composée de l'eau, formate d'amonium (1M) et acide formique (0.1M). Pour la phase organique, on change l'eau par le méthanol.

1.2.5 Extraction

Quatre cents microlitres d'acétonitrile (1N) sont ajoutés sur 200 microlitres du plasma dopée par le mélange des pesticides. Une agitation de quelques minutes ensuite en ajoute 10mg de la poudre QUECHERS. Le mélange est centrifugé pendant 10 minutes. Le surnageant organique est ensuite évaporé sous azote pendant 5 minutes à 45°C. La récupération se fait avec 100 microlitres de la phase organique et de la phase aqueuse (V/V) depuis les tubes d'évaporation. Seulement 10 µl microlitres sont injectés dans la LC-MS/MS.

La phase aqueuse (A) est composée de l'eau, du formate d'amonium (1M) et d'acide formique (0.1M). Pour la phase organique (B), on change l'eau par le méthanol, selon le gradient illustré dans le tableau 1. La colonne Restek Ultra PFPP (5µm, 50×2.1 mm).

La lecture des résultats de la LC-MS/MS est faite par le logiciel Analyst®1.6.2 version 2013, à l'aide des MRMs, le temps de rétention (T_R) et aussi la recherche dans la bibliothèque. Les valeurs trouvées après optimisation manuelle sont mentionnée dans le tableau 9. Le traitement des données, ainsi que la confection des figures, ont été réalisés avec le logiciel Excel.

2 Résultats

2.1 Optimisation

Généralement les MRMs des molécules et les énergies de collision et les potentiel sont pris des références organisées par les fabricateurs. Une optimisation des valeurs de façon manuelle est souhaitée. Les valeurs utilisés dans ce travail sont résumées dans le tableau 8.

Tableau 8: Les TR et MRM et énergies trouvées par optimisation

Familles	Les molécules	Q1	Q3	TR	DP	EP	CEP	CE	CXP
Carbamates	Aldicarbe	213	89	4,53	41	10,5	12	21	4
	Carbaryl	202,1	145	525	26	11,5	14	13	4
	Carbofuran	222,4	123,1	5,03	41	8,5	18	24	4
	Methomyl	163,1	88	3,5	21	9,5	12	11	4
Organophosphorés	Chlorpyriphos	350	97	8,97	41	8,5	20	45	4
	Diazinon	305	169,1	7,8	46	7	18	25	4
	Dimethoate	230	125	4	26	7,5	16	25	4
	Fenithrithion	278	125	6,9	61	7	18	23	4
	Malathion	331	99,1	6,8	36	8,5	18	29	4
	3, 5,6 trichloropyridol	198	107	8,96	56	12	10	41	4
	Parathion	292	236	7,48	51	8,5	14	17	6
	Parathion methyl	264	125	6,35	46	9	14	23	4
	Paraoxon methyl	248,1	202	4,78	51	9	14	19	6
Pyréthronoïdes	Cypemethrin	416	191	9,5	46	8	18	19	4
	Deltamethrine	523	280	9,54	61	6	20	21	6

2.2 Détection

L'injection d'un blanc-solvant (Figure 11) permet de confirmer l'absence des interférences. Détection des molécules des pesticides (Figure 12). Les temps des rétentions trouvés concordent avec ceux configurés après optimisation (Tableau 9).

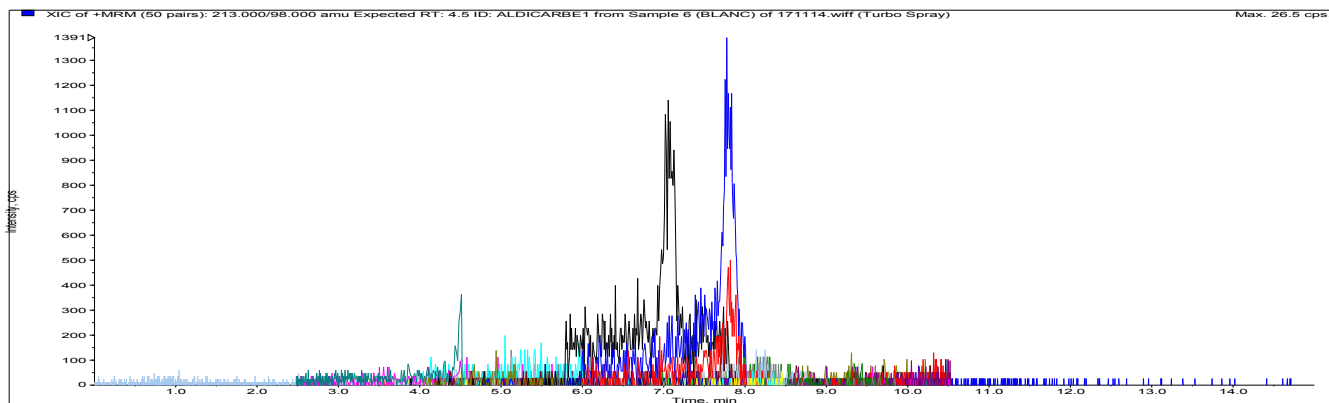


Figure 10 :Chromatogramme du blanc (méthanol)

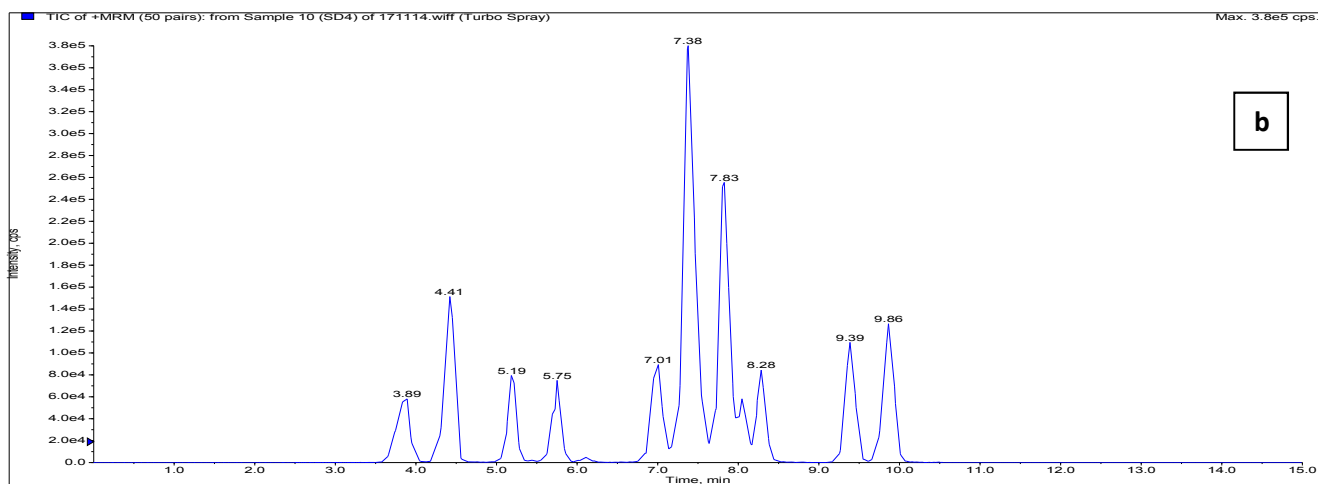
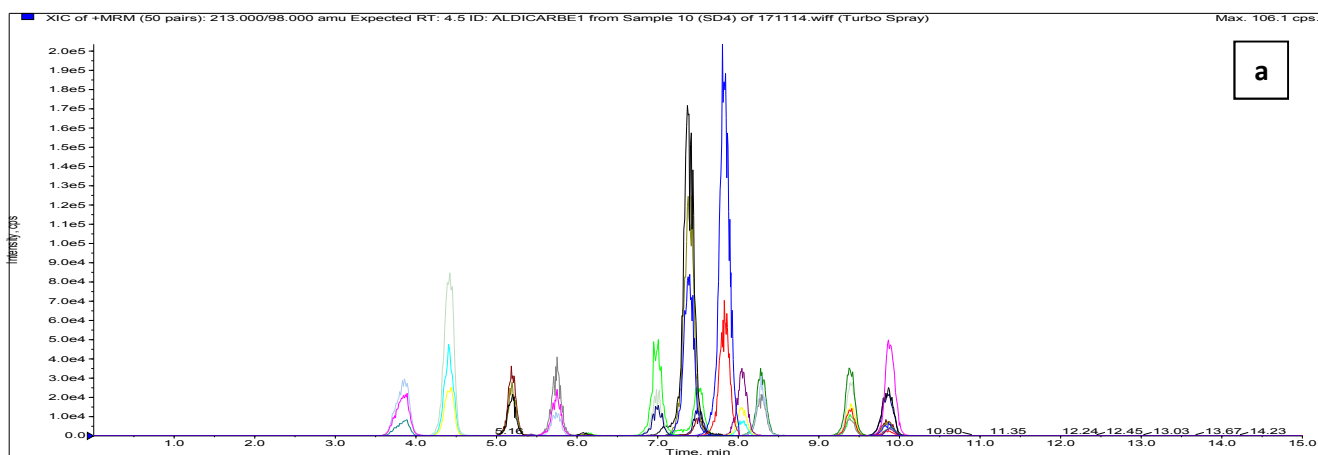


Figure 11 : Chromatogrammes du total des MRMs (a) et du TIC des MRMs (b) du mélange du standard des pesticides dans le solvant.

Le spectre de masse et le chromatogramme des MRM de chaque molécule est affiché par le logiciel. La figure 3 illustre le chromatogramme des MRMs et le spectre de masse du diméthoate.

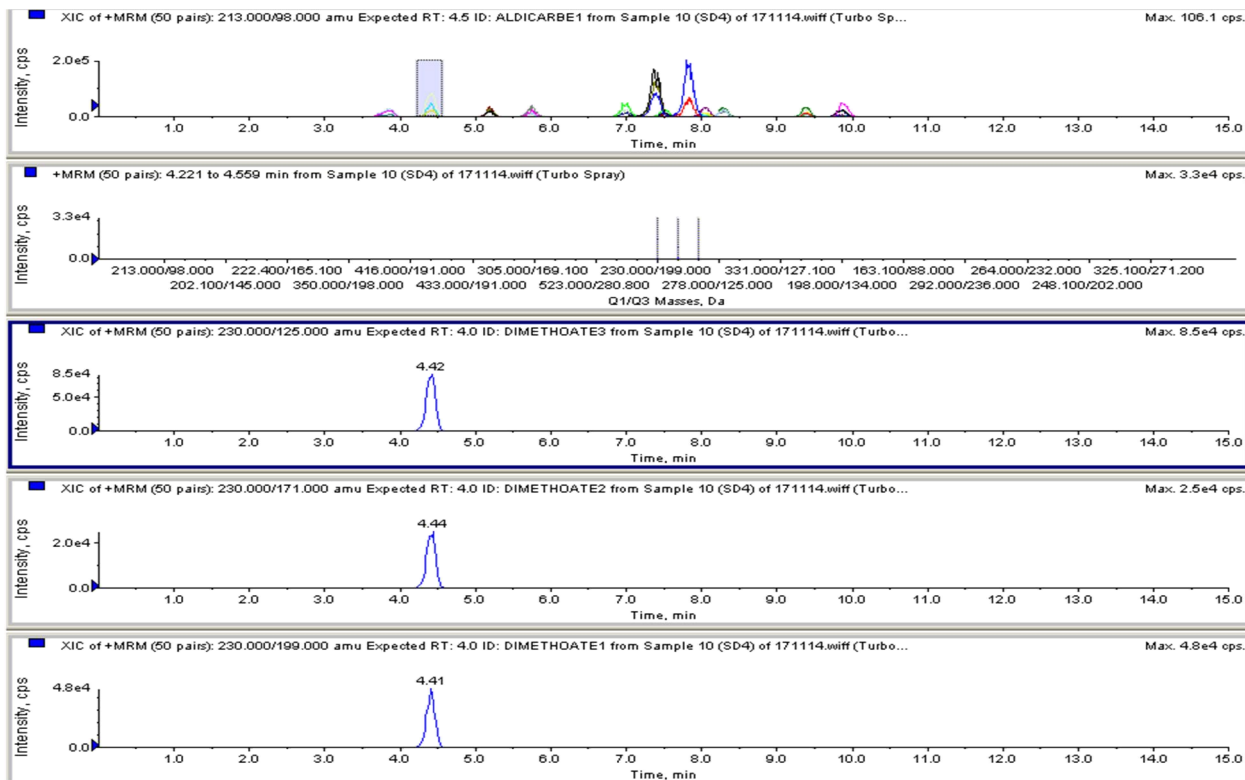


Figure 12 : Les MRMs et le spectre de masse du Diméthoate, à partir du chromatogramme du mélange

2.3 Quantification

Le choix de la gamme d'étalonnage est important. Il dépend de la limite de quantification (LOQ). Pour cette validation, il existe quatre groupes de pesticides différenciés par leur gamme de concentrations. Groupe 1 : de 100 à 1000ppb (aldicarb et parathion methyl), groupe 2 : de 10 à 100 ppb (carbaryl, carbofuran, chlorpyrifos, 3,5,6 trichloropyridol et methomyl), groupe 3 : de 25 à 250ppb (cyprmethrin, fenitrothion, malathion et parathion), groupe 4 : de 5 à 50 ppb pour le diméthoate, groupe 5 : de 2.5 à 25 ppb pour le paraxon méthyl et en fin groupe 6 pour le Diazinon avec une gamme de 0.5 à 5 ppb (Tableau 9).

Tableau 9 : Gammes des concentrations en ppb des pesticides utilisées pour la quantification

Molécules	SD1	SD2	SD3	SD4
Aldicarb	100	200	500	1000
Carbaryl	10	20	50	100
Carbofuran	100	200	500	1000
Chlorpyrifos	10	20	50	100

Cypemethrin	25	50	125	250
Diazinon	0,5	1	2,5	5
Deltamethrine	25	50	125	250
Dimethoate	5	10	25	50
Fenithrithion	25	50	125	250
Malathion	25	50	125	250
3,5,6 trichloropyridol	10	20	50	100
Methomyl	10	20	50	100
Parathion	25	50	125	250
Parathion methyl	100	200	500	1000
Paraoxon methyl	2,5	5	12,5	25

Ainsi le SD1 est la LOQ de chaque molécule d'après le tableau 9.

Les courbes de linéarité sont données par le logiciel Analyst (Figures 13) .

Les coefficients de régrétion sont résumés dans le tableau 10. La liniéarité des gammes est verifiées pour toutes les molécules ($R^2 > 0.99$).

Tableau 10: Les R^2 des courbes de liniéarité des pesticides

Les molécules	R^2
Aldicarb	0,996
Carbaryl	0,9988
Carbofuran	0,98
Chlorpyrifos	1
Cypermethrin	0,9995
Diazinon	1
Deltamethrin	0,9994
Dimethoate	0,9992
Fenithrothion	0,9971
Malathion	0,9969
3,5,6-trichloro-2-pyridinol	0,9998
Methomyl	0,9976
Parathion	0,9999
Parathion methyl	0,9971
Paraxon méthyl	0,9998

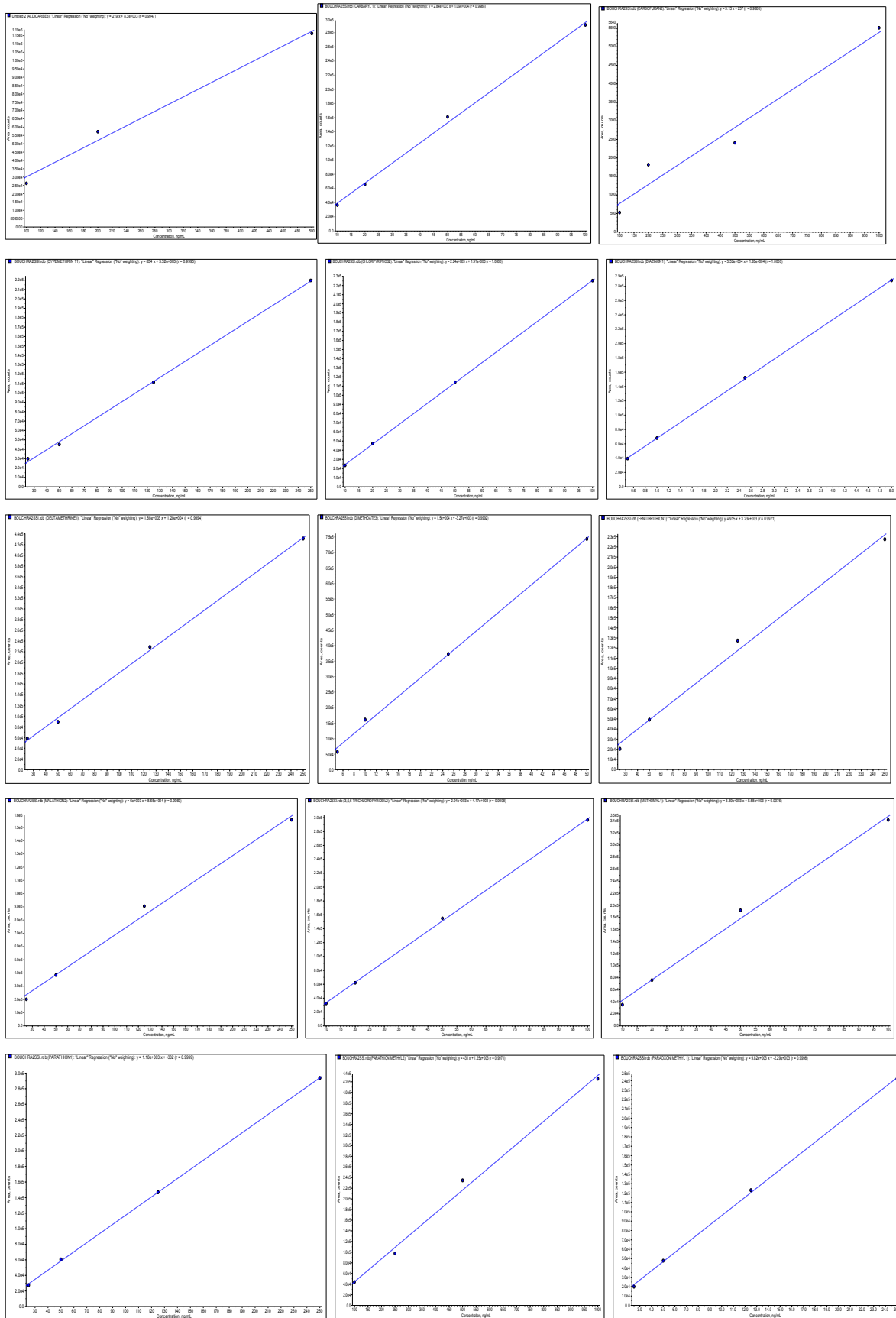


Figure 13 : Courbes de liniéarité des 15 pesticides

3 Discussion

Ce travail s'intéresse à l'optimisation de méthode de détection de 15 pesticides insecticides par la LC-MS/MS en utilisant l'extraction modifiée par QuEChERS. L'utilisation de cette technique chromatographique permet de trouver des limites de détection très petites. La combinaison entre la MS/MS permet de coupler les transitions de masse et les temps de rétention pour pouvoir identifier et confirmer la présence des molécules [131].

L'utilisation de l'acide acétique est recommandé pour éviter la dégradation des pesticides et permet l'adsorption des molécules apolaires. L'acétate de sodium est ajouté pour tamponner la solution à un pH entre 4 et 5 qui évite la dégradation des composés [131].

Pour l'optimisation des conditions du triple quadripôle MS/MS, repose sur le choix de l'ion précurseur et l'ion produit mais aussi l'optimisation des énergies de collision pour une bonne réponse de chaque composé [132]. Utilisant la littérature, les ions parents pour chaque composé ont été choisis et confirmés par l'injection des pesticides séparément pour le choix des énergies de collision [132].

L'utilisation de QuEChERS dans les matrices biologiques n'est pas usuelle selon González-Curbelo et al [133]. Notre investigation dans ce sens a donné des résultats comparables à ceux d'autres études.

La linéarité des molécules est vérifiée avec des R^2 supérieurs à 0.99. Les limites de quantification varient entre 0.5 et 100 ppb.

La validation de cette méthode est à envisager en continuant la vérification des paramètres de reproductibilité, la répétabilité, la stabilité, le rendement d'extraction, et ce dans le solvant et dans les matrices biologiques.

Chapitre 2 : Méthode sélective de quantification du diazinon dans le plasma humain par GC-MS

Le diazinon est une molécule synthétique de la famille des insecticides organophosphorés. Il est utilisé dans le jardinage et dans l'agriculture. Cette molécule est toxique pour les êtres vivants et surtout les humains. Selon l'OMS le diazinon est défini comme composé modérément dangereux (Classe II) [111]. Cette molécule inhibe l'acétylcholinestérase, une enzyme très importante pour le système nerveux. De même, cet organophosphoré est responsable de plusieurs intoxications dans le monde surtout dans les pays en développement [63].

Son utilisation excessive suggère que le meilleur moyen de surveillance de l'exposition a diazinon est par les matrices biologiques humaines [134]–[138]. D'ailleurs, les métabolites sont les biomarqueurs d'une certaine exposition surtout dans les urines [138]. Mais une exposition récente permet la détection de la molécule mère [139]–[141].

Les techniques séparatives chromatographiques et les méthodes d'extraction permettent de garantir la détection et même la quantification des pesticides dans les matrices biologiques. Cette étude, a permis de développer une méthode simple et sélective pour l'identification et la quantification du diazinon dans le plasma humain par extraction LLE et GC-MS.

1 Matériels et méthodes

Le diazinon ($m/z = 304$) (Figure 19) a été préparé dans l'isooctane. Et l'extraction a utilisé le tampon carbonat de sodium et la mixture des solvants dichlorométhane/promanol-2/heptane.

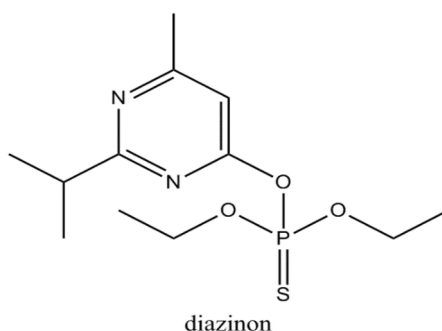


Figure 14: Structure chimique du diazinon.

1.1 Solvants

Le produit standard du diazinon (250mg, 98.3%) était de chez Fluka Analytical (Allemagne) et le solvant isooctane (2,2,4 triméthylpentane, 99%) de chez Sigma Aldrich (Etats unies). Le plasma humain a été obtenu du centre national de transfusion du Maroc à Rabat.

1.2 Instrumentations

Les échantillons sont analysés par une spectrométrie de masse PerkinElmer, Clarus® SQ 8C couplée à la chromatographie gazeuse GC Clarus® 680 GC-PerkinElmer. La colonne utilisée est Rxi R- 5ms 5% diphenyl / 95 % dimethyl polysiloxane (30m × 0.25 mm ID 0.25 mm). L'injecteur est à une température 280 °C avec le mode splitless. Le gaz est le helium avec un débit 1 ml/min. La GC-MS est la technique qui détecte plusieurs molécules de pesticides. La méthode utilisée est le full scan ou ce qu'on appelle Single Ion Monitoring (SIM). En cas de suspicions de molécules précises, une recherche ciblée est faite en cherchant les masses m/z dominantes de la molécule.

1.3 Calibration

Les solutions de calibration (1 à 10 mg/mL) étaient préparées dans l'isooctane et stockées en obscurité à -20°C. Dans le même solvant les solutions standards de calibration ont été dopées à six niveaux (5, 10, 20, 100, 200 et 500 ng/mL). Ces concentrations sont préparées de façon journalière sur trois jours et injectées cinq fois par jour pour chaque préparation.

1.4 Préparation de l'échantillon

Trois solutions standards du diazinon (15, 250 et 375 µg/L dans isooctane) et le standard interne (prazepam, 200 ng/mL) ont été préparées.

On a dopé trois échantillons de 1 mL de plasma avec les solutions standards du diazinon. Les préparations sont agitées pendant 5 secondes. On a ajouté 1 mL du tampon carbonate de sodium, 5mL du mélange dichlorométhane/promanol-2/ heptane et 100µl du prazepam.

On a utilisé le prazepam comme standard interne à cause de sa disponibilité dans le laboratoire. Cette molécule est utilisée pour sa stabilité et aussi parce qu'il n'existe aucune interférence avec elle sous nos conditions analytiques (tous les composés ont des temps de rétention différents).

La préparation est mélangée pour 10 minutes et centrifugée avec 4000 rpm pour 10 autres minutes de plus. Le surnageant est transféré un tube de 20 ml et évaporé sous azote à 40°C.

Le résidu est reconstitué ensuite avec 100µl de l'isooctane. Après agitation pour 1 minute, seulement 10 µl est injecté dans la GC-MS.

1.5 Analyse par la GC/MS

On a utilisé un programme de température optimal avec le mode SIR (Selected Ion Recording). La température du four était initialement à 80°C pour 1 minute ensuite augmenté à 290°C pour 10 minutes avec 20°C/min. La température de l'injecteur, de la source ion et la ligne de transfert sont respectivement 250°C, 230 °C et 270°C.

La masse du spectromètre est opérée avec impact d'électro (70 eV), avec un total temps de scan d'une seconde. L'analyse prend 18 minutes. L'analyse des données de la GC-MS est faite par le logiciel TurboMass version 6.0 et la librairie NIST version 2008.

Pour une bonne concordance, le R.Match doit être entre 900 et 1000; le logiciel indique le niveau de similarité entre la masse du spectromètre trouvée et celle dans la bibliothèque. Après l'acquisition du chromatogramme totale par le mode scan, les pics sont identifiés par le temps de rétention et la masse du spectre. L'étape de la confirmation utilise le mode SIR, en choisissant la masse caractéristique de l'ion parent et des fragments du diazinon ($m/z = 304, 179, 137, 152$ and 29), et du prazepam ($269, 295$ and 91). L'ion parent est le plus abondant pour chaque composé.

2 Résultats

2.1 Détermination par la chromatographie gazeuse

L'analyse est réalisée avec le mode SIM (Single Ion Monitoring) en utilisant les ions du diazinon et du prazepam. L'identification est basée sur le temps de rétention et la masse spectrale. Le diazinon est détecté à 6.93 min et le prazepam à 17h30 min (Figure 15).

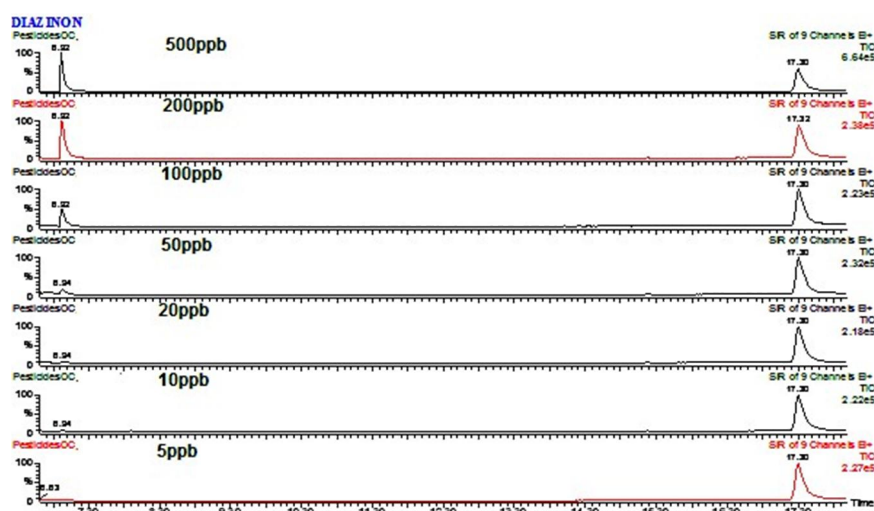


Figure 15: Chromatogrammes de différentes concentrations des standards de calibration.

Cinq échantillons blanc sont injectés respectivement. Aucune détection à 6.93 et 17.30 min n'a été notée. Cependant, cette étude est sélective pour le diazinon et l'effet de matrice est vérifié.

Une nouvelle molécule, O,O-diethyl phosphonothioate (m/z 137) a été trouvée (Figure 16). C'est un produit de métabolisme du diazinon [134]. Seifert et al.[142] a nommé cette molécule comme étant le produit hydrolytique majeur du diazinon. Les auteurs ont identifiés la molécule par le contrôle de l'hydrolyse à pH 2.4 avec 50 C° pour 48 heures.

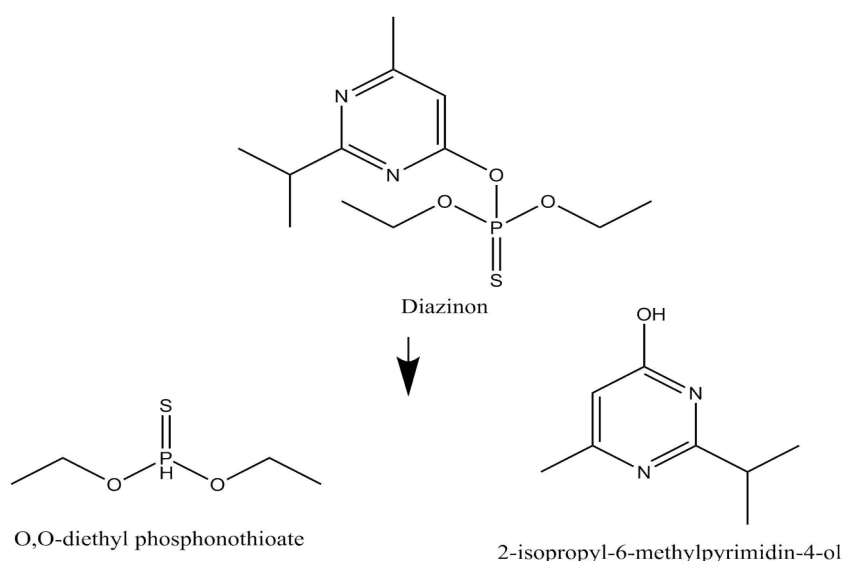


Figure 16: Dissociation du diazinon (O,O-diethyl phosphonothioate; m/z et 2-isopropyl-6-methylpyrimidin-4-ol).

Pour trois jour, quatre concentrations (5, 15, 250, 375µg/L) de la mixture standard sont injectés et répétés cinq fois. Le coefficient d'erreur est inférieur à 20% pour les concentrations calculées. La détection par la GC-MS donne des résultats sélectifs et le bruit de fond est éliminé. Cette analyse détermine la spécificité de la méthode.

2.2 Méthode de validation

2.2.1 Linéarité de la courbe de calibration

La courbe de calibration donne une excellente linéarité. La courbe de calibration est obtenue par la superposition entre les aires de pics pour chaque concentration détectée en comparaison avec les concentrations du logiciel TurboMass.

La linéarité est donnée par le calcul de la ligne de régression exprimée par le coefficient de corrélation R^2 (0.999). Les résultats de notre linéarité sont illustrés sur la Figure 17. Le tableau 11 montre que les coefficients d'erreurs trouvés sont acceptables.

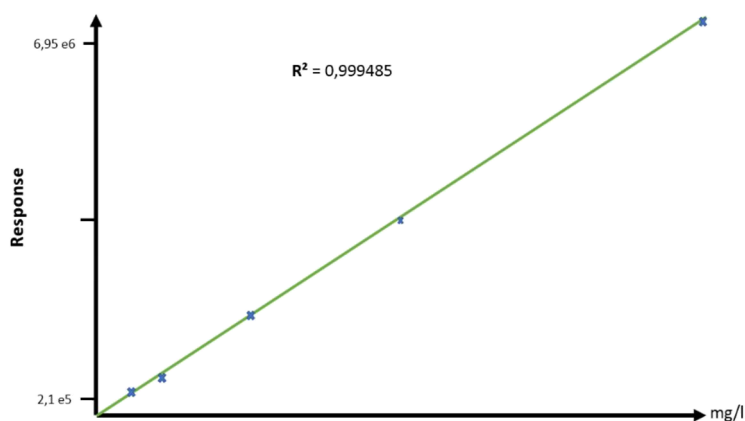


Figure 17: La courbe de calibration linéaire du diazinon.

Tableau 11: Les concentrations calculées pour les standards de calibration et l'erreur relative ER

Standards ($\mu\text{g/l}$)	Premier essai	ER*
5	4,55	9
10	11,49	14,9
20	19,37	3,15
50	52,04	4,08
100	91,70	8,3
200	212,30	6,15
500	526,51	5,3
R^2	0,9995	
*ER < 20%		

2.2.2 Limite de détection (LOD) et Limite de quantification (LOQ)

La LOD et LOQ sont déterminées comme étant la concentration, détectée ou quantifiée, la plus faible, en prenant en considération un ratio de 1:3 et 1:10 du bruit de la ligne de base et du point de calibration, respectivement. La LOD et LOQ sont répétés cinq fois pour la confirmation. Les valeurs trouvées pour la LOD et LOQ sont $2\mu\text{g/L}$ et $5\mu\text{g/L}$.

2.2.3 Exactitude et précision

L'analyse est répétée cinq fois pour trois jours dans les mêmes conditions. Le pourcentage moyen des rendements des trois concentrations des échantillons du plasma dopé (15, 250 and 375 μ g/L) varie entre 22.8% et 31%. La répétabilité est évaluée par le coefficient de variation (CVr). Tous les résultats donnent un CVr entre 2.24 % et 15.8%.

3 Discussion

Notre objectif est de développer une méthode sélective pour la quantification du diazinon dans le plasma humain par la GC-MS. A cause de la nature d'usage de cette molécule et de ces effets néfaste, notre méthode est optimisée et adaptée pour application sur des échantillons réels.

La source principale d'imprécision pour la détection des pesticides, particulièrement dans les matrices biologiques, est associé à la présence d'éléments interférant appelé effet de matrice.

On a pu spécifier et sélectionner notre molécule en utilisant la GC-MS. L'optimisation par la méthode SIR a donné une bonne performance et précision. De plus, plusieurs programmes de températures ont été testés et ont utilisé un programme de 18 minutes. L'injection de plasma vierge et une autre dopé par 100 μ g/L du diazinon a confirmé qu'il n'existe aucune interférence dans la préparation. Cependant, la sélectivité et la spécificité de la méthode ont été vérifiées.

Six concentrations du plasma dopé variant linéament de 5 à 500 μ g/L, ont montré une excellente linéarité exprimée par une coefficient de corrélation dépassant 0.99.

La LOD et la LOQ trouvée, à 2 μ g/L et 5 μ g/L respectivement, on permet la détection et la quantification évolutive du diazinon dans le plasma dopé. Cette concentration est inférieure à d'autres limites trouvés par certains auteurs [143]–[146] avec une exception Naksen, Pérez et Lacassie [147]–[150] qui ont trouvés limites proches à les nôtres.

Pour les trois concentrations testées, le rendement moyen trouvé varie entre 22.8% et 31%.

Notre étude montre de valeurs supérieures à celles trouvées par Naksen [147] qui a utilisé une extraction en phase solide (SPE). G. Gallardo et al. [151] a trouvé un pourcentage de 6.7% dans des échantillons de sang en utilisant la méthode microextraction en phase solide (SMPE). On doit mentionner que F. Guan et al. [152] ont trouvé un rendement entre 3.2% à 7.2 % pour le sang total.

Les valeurs trouvées pour nos rendements peuvent être causées par plusieurs paramètres. Premièrement, l'utilisation de la LLE, qui peut causer la perte d'une partie importante du composé. De plus, une agitation excessive ou bien le temps de contact réduit entre le composé et le solvant augmente les chances d'avoir des rendements réduits. En addition, le pH influence le rendement de l'extraction [151]. Dans notre travail, on n'a pas utilisé d'acide parce qu'il se peut qu'il dégrade le composé [19]. Par ailleurs, l'étape d'évaporation peut éliminer une partie de la molécule surtout si elle est volatile. D'ailleurs, des erreurs de manipulation comme la mesure incorrecte des volumes peuvent influencer le rendement final.

Malgré ces rendements trouvés, on a pu avoir une excellente linéarité exprimé par R^2 , une bonne précision et des limites LOD et LOQ très significatives. Notre méthode est validée et vérifiée et peut être utilisée pour d'autres matrices biologiques.

Les méthodes chromatographiques deviennent de plus en plus efficace pour la séparation de composés depuis des mélanges complexes. La plus part des chercheurs analystes recommandent ces méthodes pour plus de précision. D'ailleurs, une méthode analytique doit être validé pour garantir des résultats fiables pour les mesures dans le laboratoire.

Dans cette étude, une méthode sélective de détection et de quantification du diazinon dans le plasma humain a été validée. Les résultats ont montré des paramètres de validation satisfaisant dans le plasma humain parce que le diazinon a été détecté à des concentrations très petites avec une bonne linéarité. Cette méthode sélective du diazinon est considérée comme une bonne contribution dans le domaine de la toxicologie clinique et légale.

*Partie 3 : Apport de la chromatographie dans les
intoxications aiguës et l'exposition professionnelle*

Chapitre 1 : Apport des analyses toxicologiques sur les intoxications aiguës par les pesticides chez la population marocaine

1 Méthodes et matériels

Il s'agit d'une étude rétrospective décrivant les intoxications par les pesticides depuis Janvier 2014 jusqu'à Septembre 2020 chez une population marocaine. Les données sont collectées des enregistrements des analyses demandées depuis les hôpitaux marocains reçues au laboratoire du CAPM (CAPM-LAB).

Les critères d'inclusion, toutes les analyses de screening large soit d'une demande avec orientation ou non vers les pesticides et avec un résultat positif.

Les critères d'exclusion, toutes les analyses non orientées vers des pesticides et avec un résultat négatif.

Les cas sont décrits en se basant sur les caractéristiques démographiques (Age, genre, date d'analyse, provenance) et sur les caractéristiques toxicologiques (Symptômes, nom du pesticide). La classification des pesticides est faite à la base de la composition chimique.

1.1 Traitement des prélèvements au laboratoire

Le laboratoire reçoit des échantillons des hôpitaux publics et privés de façon régulière pour des demandes de recherche de toxique pesticides ou autres (dosage de médicaments, métaux lourds et des alcools... etc.). Chaque analyse est faite suite à une demande du médecin traitant. Pour les analyses toxicologiques, les prélèvements sont effectués au niveau du service demandeur et ils sont acheminés au laboratoire par un ambulancier ou par un proche du patient. Généralement, toutes analyses s'appuient sur les signes cliniques communiqués par le médecin demandeur. Une demande sans aucune indication ou avec un tableau clinique qui n'aident pas à orienter les analyses, fait appel à un screening large des substances présentes dans les prélèvements.

A la réception des échantillons sont identifiés, numérotés et rapportés sur le registre après la vérification de la conformité. Pour le sang, des tests rapides peuvent être fait avant la centrifugation pour l'obtention du plasma. Les urines, le plasma et le lavage gastrique sont

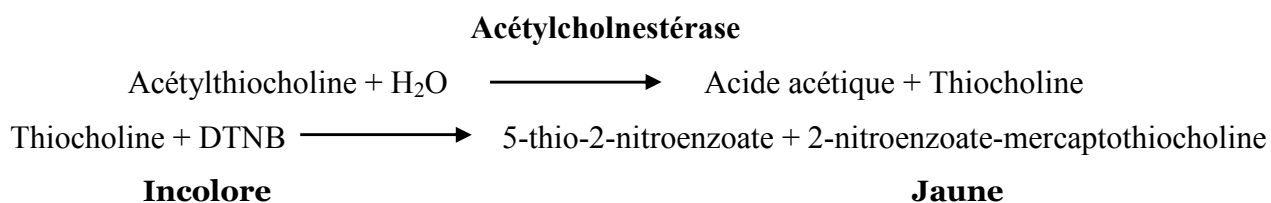
ensuite acheminés vers l'analyse chromatographique multi-systématique par GC-MS et LC-MS/MS après une extraction liquide-liquide. L'utilisation d'une méthode multi systémique permet de cerner un grand nombre de molécules. L'extraction liquide-liquide est utilisée pour son faible cout et son accessibilité au niveau du laboratoire.

Après l'analyse, les prélèvements de la toxicologie d'urgence sont conservés une semaine au réfrigérateur (4° à 8°C) puis ils sont détruits selon la procédure de gestion des déchets du laboratoire.

1.2 L'activité cholinestérasique

Pour la mesure de l'activité cholinestérasique, deux méthodes sont employées. Test-mate ChE Cholinesterase Test System (Model 400) et ChE check mobile.

La révélation de l'activité enzymatique est réalisée avec la méthode d'Ellman qui utilise un substrat artificiel, l'acétylthiochoine, dont l'hydrolyse conduit à la formation de thiochoine. Cette dernière forme un dérivé coloré avec le DTNBB (5-5'-dithiobis – [2 nitroenzoate]) selon l'équation bilan suivante :[19]



1.2.1 Méthode 1: Test-mate ChE Cholinesterase Test System (Model 400)

Le Test-mate ChE Cholinesterase Test System (Model 400) est un analyseur photométrique. Avec un photomètre d'absorption à longueur d'onde fixe, alimenté soit par une batterie 9 volts, soit par un adaptateur secteur externe [153]. Cet instrument analytique guide l'opérateur étape par étape tout au long de la procédure de test. L'analyseur photométrique mesure les absorbances pendant la procédure de test, calcule les concentrations finales de l'analyte, compense la température de ces concentrations à l'aide d'un capteur de température intégré et affiche ensuite les résultats finaux du test. Le système du Test-mate ChE est basé sur la méthode Ellman [19]. L'acétylthiochoine (AcTC) ou la butyrylthiochoine (BuTC) est hydrolysée respectivement par AChE ou PChE, produisant de l'acide carboxylique et la thiochoine qui réagit avec le réactif d'Ellman (DTNB, acide dithionitrobenzoïque) pour former une couleur jaune qui est mesurée par spectrophotométrie à 450 nm. Le taux de formation de la couleur est proportionnel à la quantité d'AChE ou de PChE. Le kit de test AChE se compose de trois boîtes avec une notice d'emballage détaillée. La première et la

deuxième boîte du kit contiennent chacune 48 flacons remplis de quantités précisément mesurées de solution tampon. La troisième boîte contient une plaque de réactif érythrocytaire à 96 puits, 100 tubes capillaires (volume de 10 μ L), 100 papiers filtres (lingettes capillaires), un flacon compte-gouttes en plastique transparent de 30 ml rempli de 18 ml d'eau distillée et 2 pipettes de transfert.

Les résultats sont donnés par pourcentage pour l'AChE et la BChE et aussi l'hémoglobine en g/dL. Un pourcentage inférieure à 50 % indique une intoxication par les pesticides et nécessite une élimination du poste d'exposition et le traitement par l'antidote (atropine et pralidoxime).

1.2.2 Méthode 2 : ChE check mobile

Le ChE check mobile est un photomètre. Il s'agit d'un système portable développé par Securetec en collaboration avec des experts en science médicale des forces armées allemandes[154]. C'est un analyseur photométrique qui mesure, dans le sang entier, l'absorbance et calcul la concentration de l'enzyme cholinestérase [10]. Le même protocole est suivi pour les deux mesures ; AChE et BChE.

L'interprétation des résultats se base sur l'intervalle des valeurs recommandées par le photomètre. Il s'agit des valeurs comprises entre 33.0 et 49.4 U/gHb pour l'AChE et entre 1623 et 3861 U/L pour la BChE. Des valeurs inférieures à cet intervalle indiquent une intoxication par les organophosphorés et/ou des carbamates.

1.3 Techniques chromatographiques

1.3.1 GC-MS

Les échantillons sont analysés par la GC-MS cité précédemment. Un temps d'analyse de 42 minutes est utilisé. La recherche est faite à l'aide de la bibliothèque NIST et le logiciel TurboMass. La recherche par GC-MS est affinée par méthode SIM.

1.3.2 LC-MS/MS

Pour la recherche des pesticides dans les prélèvements une LC-MS/MS est utilisée. Un temps d'analyse de 15 minutes a été choisi avec 10 microlitres comme volume d'injection. La phase aqueuse est composée de l'eau, formate d'amonium (1M) et acide formique (0.1M). Pour la phase organique, on change l'eau par le méthanol. L'injection est simultanée avec la GC-MS avec la même extraction.

1.3.3 Solvants

L'analyse chromatographique a utilisé le méthanol (99.9%) et le format d'ammonium (99.99%) de Sigma Aldrich, L'acide formique (99%) et le dichlorométhane (99.9%) de Carlo Ebra, le propanol-2 (99.9%) de Panreac et l'heptane (99%) de Scharlar.

1.3.4 Extraction

Une extraction liquide-liquide est opérée pour tous les prélèvements. Le protocole d'extraction est le même pour les deux méthodes chromatographiques utilisées (LC-MS/MS et GC-MS) [155]

Un millilitre du tampon carbonate de sodium est ajouté à 1 millilitre de l'échantillon reçus (urines, plasma, lavage gastrique). Ensuite 5 millilitres du solvant d'extraction (Propanol, Dichlorométhane et l'acide formique) est ajouté. Le tout est centrifugé pour 10 minutes. L'éluant est évaporé totalement sous azote à 45 °C. La récupération depuis les tubes d'évaporation se fait avec le méthanol. Seulement 10 µl microlitres sont injectés dans la GC-MS et la LC-MS/MS.

Le prazépam est utilisé comme étalon interne pour sa stabilité dans les conditions d'extraction et d'analyse chromatographique et son temps de rétention n'interfère pas généralement avec les molécules détectées

2 Résultats

Il s'agit de 398 demandes d'analyse reçues dans cette période depuis Janvier 2014 jusqu'à Septembre 2020. Il s'agit de patients hospitalisés dans les hôpitaux marocains suspectés d'être intoxiqués par les pesticides.

2.1 Caractéristiques démographiques

L'âge des patients varie d'un jour à 78 ans avec un médian de 14 ans et un interquartile de [4-26 ans]. On a eu 129 cas avec l'âge non précisé la réception.

La tranche d'âge des enfants (entre 0 et 14 ans) est en tête de file des analyses d'intoxication par les pesticides avec un nombre de 135 cas (Figure 18). La tranche des adultes (entre 25 et 64 ans) est la suivante dans ce classement avec 63 cas puis les adolescents (entre 15 et 24 ans) avec 62 cas. Alors que les personnes âgées (de 65 ans et plus) sont notifiés avec un nombre de 9 cas seulement pendant la période d'étude.

Le sexe ratio (F/M) est de 1.5, 60% des cas sont de sexe féminin (Figure 19). À propos de la provenance des demandes, 82,8% des demandes sont d'origine de la région Rabat-Salé-Kenitra (Figure 20).

En 2018, le laboratoire a reçu le plus grand nombre de cas d'intoxication par les pesticides (n=72) selon la répartition des cas par année avec une moyenne de 57 cas par an (Figure 21).

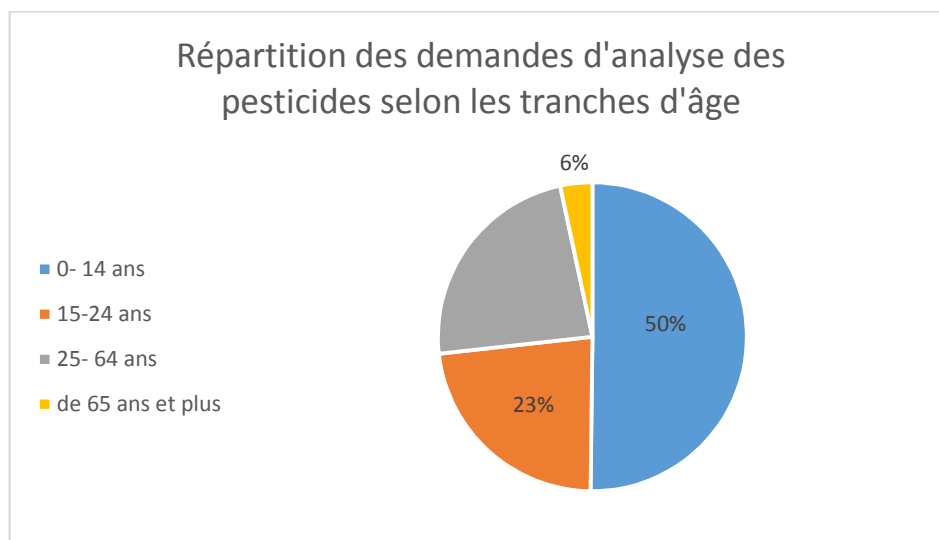


Figure 18: Répartition des demandes d'analyse des pesticides selon les tranches d'âge

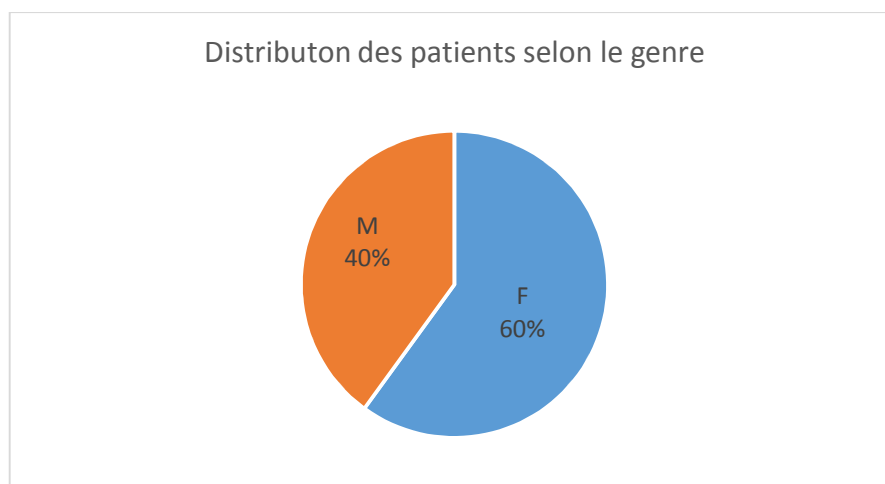


Figure 19: Distribution des patients selon le genre

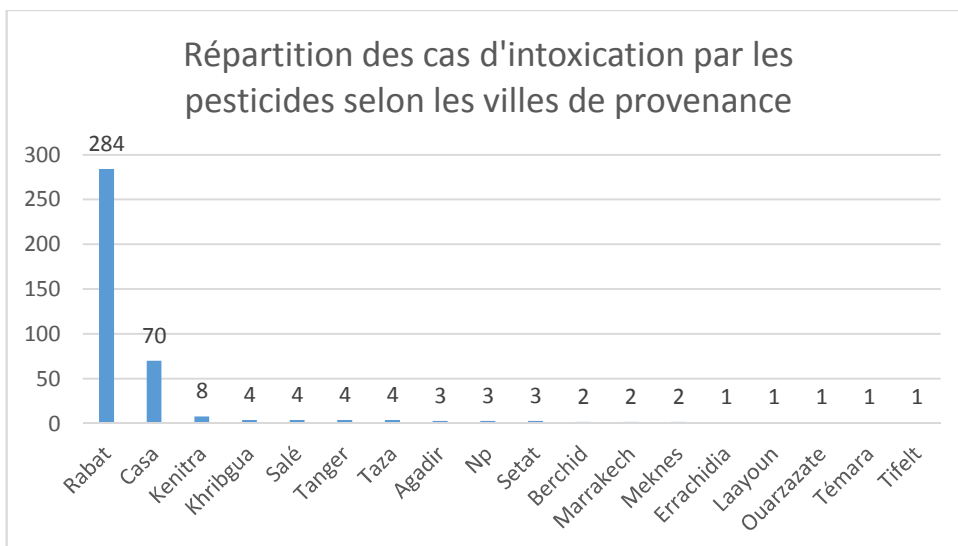


Figure 20: Répartition des cas d'intoxication par les pesticides selon les villes de provenance

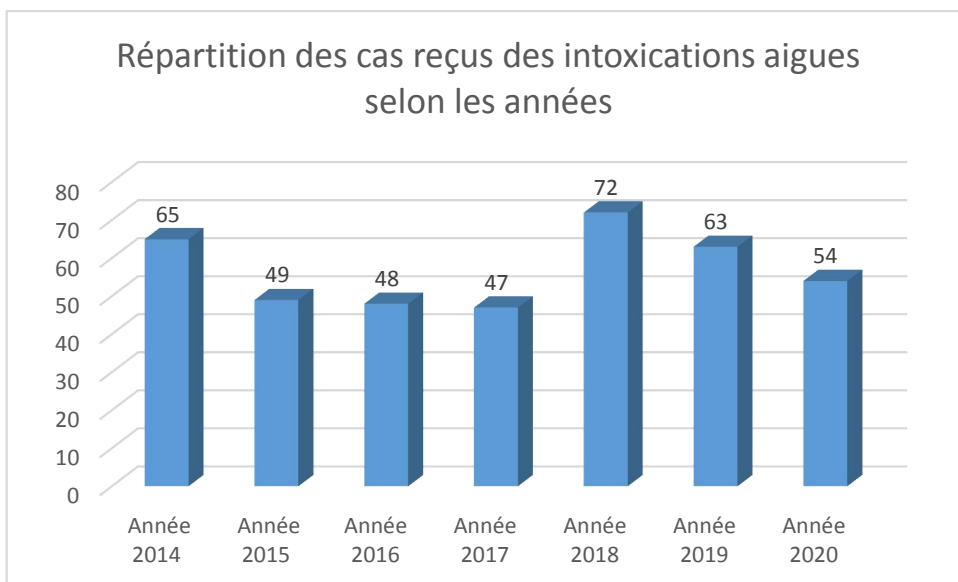


Figure 21: Répartition des cas reçus d'intoxication aiguës par les pesticides selon les années

2.2 Mesure de l'activité cholinestérasique

Dans cette étude, la mesure de l'activité cholinestérasique se fait systématiquement pour une intoxication suspectée par les organophosphorés ou les carbamates. Il existe des demandes d'activité cholinestérasique seulement sans demande de recherche chromatographique de pesticides. La mesure est faite par deux techniques photométriques, avec le même principe. Il s'agit de 295 mesures (Tableau 12).

Pour la technique Test System (Model 400), les résultats sont donnés en pourcentage. Une intoxication sévère indique des valeurs entre 25% et 0%. Il est aussi important de considérer les valeurs entre 25% et 50% parce qu'elles peuvent diriger vers une intoxication sévère probable, la répétition de la mesure est recommandée dans ce cas.

Pour le ChE check mobile, un intervalle des valeurs normales est suivi. Pour l'AChE les résultats doivent être entre 33.0 et 49.4 U/gHb pour des valeurs normales. La BChE quant à elle est normale si les valeurs sont supérieures à 1623 et inférieure à 3861 U/L.

Une grande corrélation est vérifiée avec un coefficient de corrélation proche de 1 et -1. Si le coefficient est proche de zéro, aucune corrélation n'existe entre les variables. Une corrélation de l'AChE et de la BChE avec l'âge est faite dans notre étude. Pour les résultats (Figures 29 à 32), les coefficients de corrélation sont respectivement : 0.0002, 0.0167, 0.3196, 0.0004, 0.0722 et 0.2393. Ainsi, aucune corrélation n'est observée.

Tableau 12: Analyse statistiques de l'AChE et l'BChE par deux méthodes mesurées dans le sang

Paramètres	Statistiques	F	M
Age (ans)	N	129	85
	Max	76	78
	Min	0	0.2
	Moyenne	18	18
AChE1 (%)	Max	94	100
	Min	<10	<5
	Moyenne	48.7	47.4
	Ecart type	23.3	24.3
BChE (%)	Max	100	106
	Min	<10	-14
	Moyenne	60.71	54.03
	Ecart type	28.65	28.5
AChE2	Max	53.5	82.6
	Min	4.44	6.2
	Moyenne	40.85	43.06
	Ecart type	17.7	15.23
BChE	Max	5100	5939.8

	Min	377	361.9
	Moyenne	2310.96	2453.6
	Ecart type	2285.69	2293.19

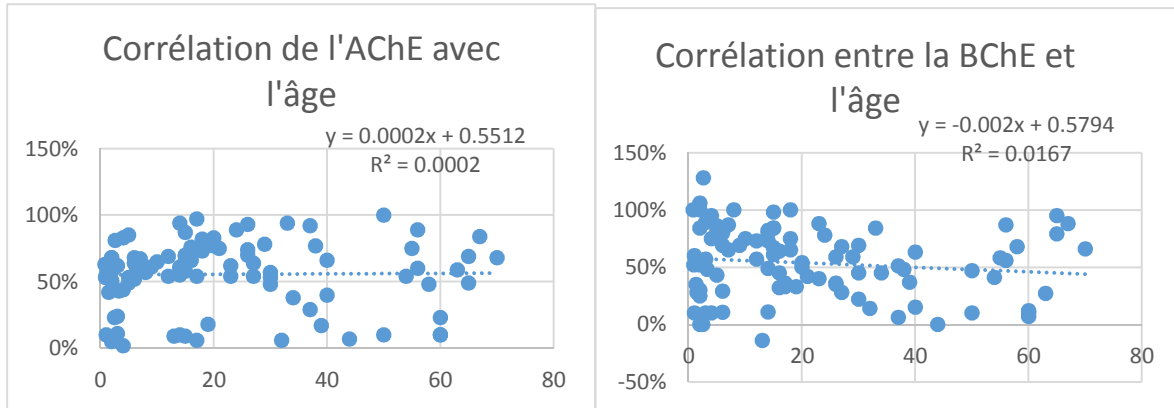


Figure 22: Corrélacion entre l'ACHe, la BChE et l'âge pour la première méthode

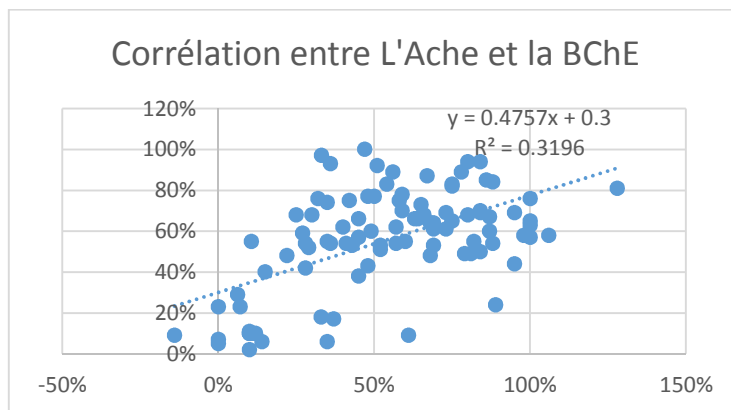


Figure 23: Corrélacion entre l'Ache et la BChE première méthode

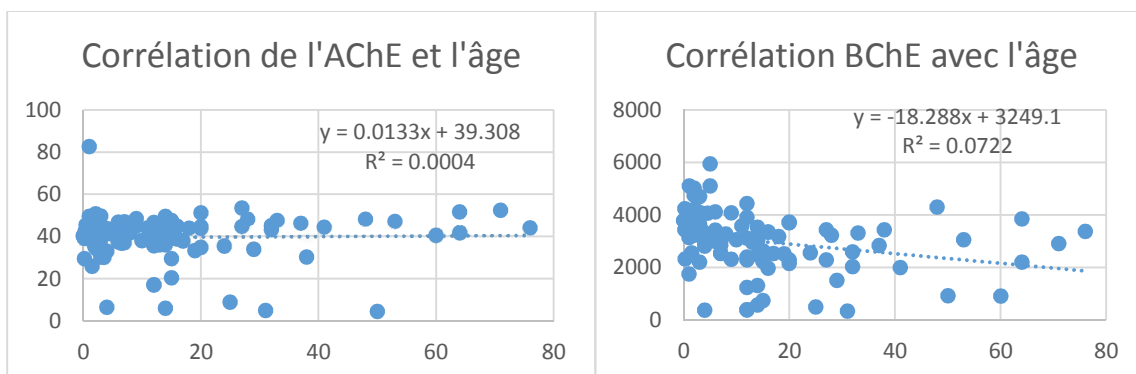


Figure 24: Corrélacion de l'ACHe, la BChE avec l'âge pour la deuxième méthode

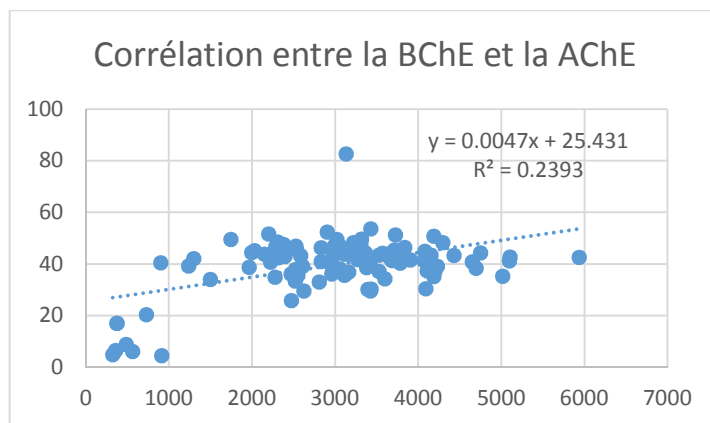


Figure 25: Corrélation entre la BChE et l'AChE pour la deuxième méthode

2.3 L'analyse chromatographique

Il s'agit de 360 analyses chromatographiques. Cette analyse a permis de confirmer la présence des pesticides chez 63 patients intoxiqués. Les 63 cas positifs incriminent plusieurs familles des pesticides (Figure 26). Les insecticides sont en premier lieu (58%), avec les Op (38%), les carbamates (33%) et les pyréthroides (24%). Les raticides en deuxième position (33%) où tous les patients étaient intoxiqués par l'alpha-chloralose. En fin de ligne, on trouve les herbicides (5%) dont 40 % des intoxications sont causées par l'amitraz. Un screening large est effectué après une extraction liquide-liquide. Une confirmation des résultats est élaborée par la masse m/z avec la GC-MS ou par MRM et la recherche par bibliothèque avec la LC-MS/MS. Tous les cas positifs sont listés dans le tableau 14. A titre d'exemple, les figures 34 et 35 montrent la détection de l'alpha-chloralose à $t_R=15.75$ min pour la GC-MS et à $t_R=2.04$ min pour la LC-MS/MS

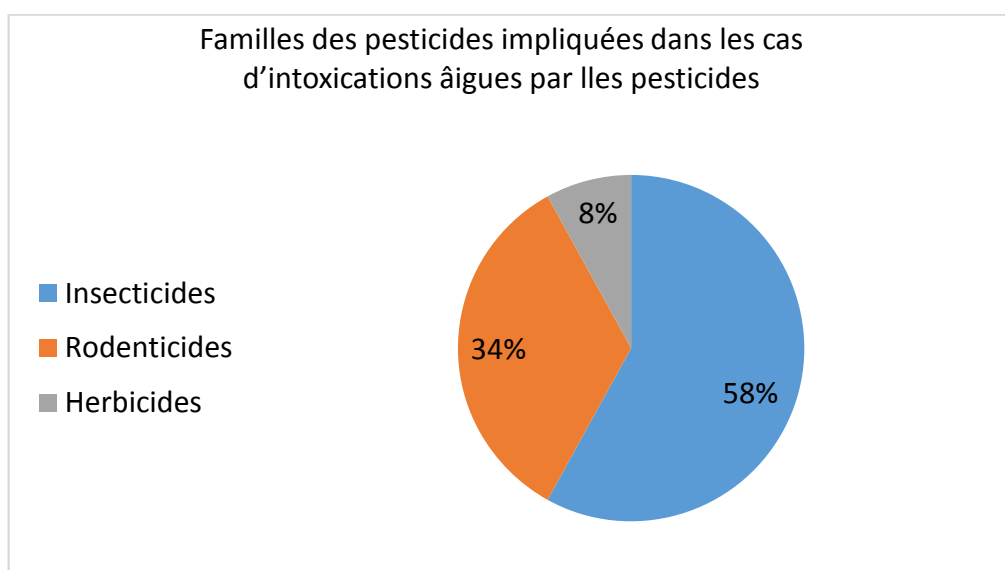


Figure 26: Familles des pesticides impliquées dans les cas d'intoxications aiguës par les pesticides

Tableau 13: Caractéristiques des cas positifs d'intoxications aiguës par les pesticides

N°	Date	Genre	Age	Pesticides	Orientation et symptômes
1	2014	F	NP	Carbofuran	**
2	2014	F	39	Carbofuran	**
3	2014	M	52	2,4 d isobutyl ester	Herbicide
4	2014	M	12	Malathion	**
5	2014	F	NP	Alphachloralose	Troubles de conscience
6	2014	M	NP	Chlorpyrifos, 3,5, 6-trichloropyridinol	Insecticides
7	2014	F	18	3,5, 6-trichloropyridinol	Coma
8	2014	M	NP	Deltamethrine	Raticides
9	2014	F	NP	Chlorpyrifos	Methomyl
10	2014	M	23	Alphachloralose	Coma
11	2014	F	NP	Alphachloralose	**
12	2014	M	2	Chlorpyrifos	Produit avec diazinon
13	2014	F	65	Alphachloralose	Insecticides
14	2014	F	NP	Malathion, Deltamethrine	Produit Igatox
15	2014	F	17	Carbofuran, 3-hydroxycarbofuran	Poudre bleue - Raticides
16	2015	M	NP	Alphachloralose	Raticides
17	2015	F	NP	Malathion, Malaxon	Organophosphorates
18	2015	F	NP	MCPA, 2,4 d, printazole	**
19	2015	F	1	Chlorpyrifos	Organophosphorates
20	2015	M	26	Chlorpyrifos, 3,5, 6-trichloropyridinol	Organophosphorates
21	2016	M	20	Deltamethrine	**
22	2016	F	19	Carbofuran	**
23	2016	M	NP	Deltamethrine	**
24	2016	F	NP	Dichlofos	Organophosphorates

25	2016	F	NP	Deltamethrine	**
26	2016	M	25	Alphachloralose	**
27	2016	F	1	2,4 d isobutyl ester	**
28	2017	F	14	Malathion	**
29	2017	M	14	Amitraz	Amitraz
30	2017	M	6	Amitraz, Terbucarb, Diazinon	Hallicination
31	2017	F	3 ans 4 mois	Terbucarb	**
32	2017	F	3	Dicaraméthyl 2,4 methyl ester, Dicamba	Coma
33	2017	M	NP	Chlorpyriphos, 3,5, 6- trichloropyridinol	**
34	2018	M	21	Alphachloralose	Convulsion, arrêt cardiaque
35	2018	F	17	Diazinon	Detresse respiratoire avec bilan biologique normal
36	2018	F	27	Alphachloralose	Raticides
37	2018	F	18 mois	Bifenthrine	**
38	2018	F	56	Malathion	Malathion
39	2018	M	38	Alphachloralose	**
40	2018	M	32	3-Hydroxycarofuran	**
41	2018	F	50	Dichlorvos, Dimethyl Phosphate	Produit Novan
42	2018	M	20	Alphachloralose	Drogue
43	2018	F		Alphachloralose	Convulsion
44	2019	M	33	Alphachloralose	Ethanol-Méthanol
45	2019	M	19	Alphachloralose	Trouble de conscience
46	2019	F	14	Alphachloralose	**
47	2019	F	NP	Amitraz	**
48	2019	F	17	Alphachloralose	**

49	2019	M	40	Alphachloralose	Raticides
50	2019	M		Carbofuran	**
51	2019	F	31	Carbofuran, 3-hydroxycarbofuran	Convulsion
52	2019	F	NP	Alphachloralose	**
53	2019	M	NP	Alphachloralose	Convulsion
54	2019	F	15	Deltamethrine	**
55	2019	F	27	Alphachloralose	**
56	2020	F	NP	Alphachloralose	**
57	2020	M	4	3,5, 6-trichloropyridinol	Convulsion
58	2020	F	NP	3,5, 6-trichloropyridinol	**
59	2020	F	2	Carbofuran, 3-hydroxycarbofuran	**
60	2020	M	NP	Chlorpyrifos, 3,5, 6-trichloropyridinol	**
61	2020	F	37	Cypermethrine, Delthamethrine	Pyréthroides
62	2020	F	65	Alphachloralose	Raticides et organophosphate
63	2020	F	14	Diazinon, 2-isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinol	Insecticides

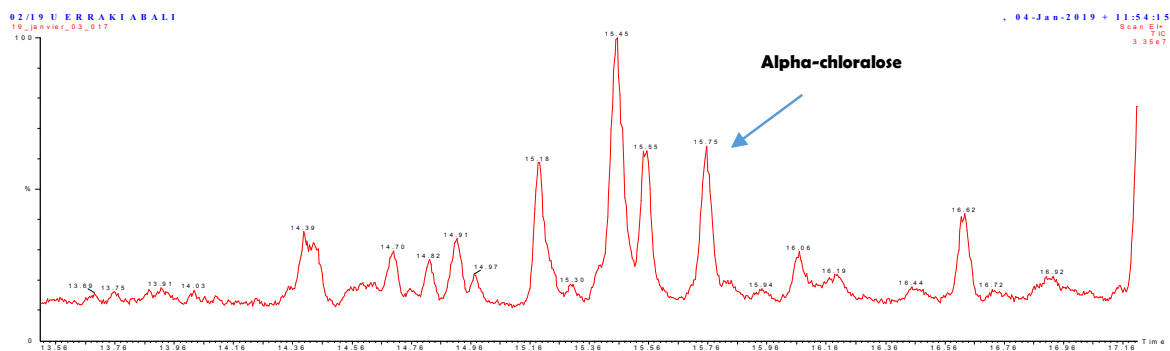


Figure 27: Détection de l'alpha-chloralose par la GC-MS

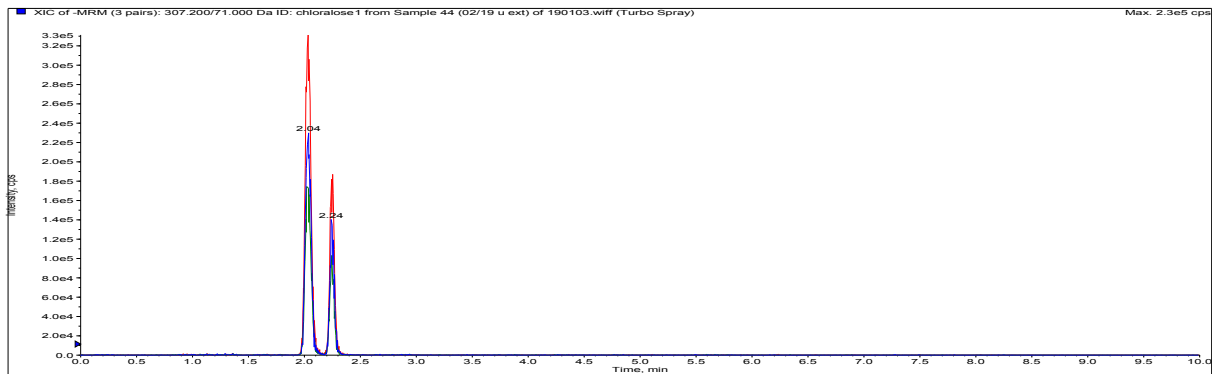


Figure 28: Détection de l'alpha-chloralose par la LC-MS/MS

3 Discussion

Les intoxications aiguës par les pesticides intéressent de plus en plus la santé publique dans le monde entier. Cette étude montre le nombre important des intoxications par les pesticides reçues dans le laboratoire. Cependant, le centre du contrôle du poison au Québec a dénombré entre 1995 et 200, 1518 cas d'intoxications aux pesticides [156][178]. En France, 408 notifications sont enregistrées entre 2012 et 2016 [68].

Il s'agit dans ce travail de 398 cas d'intoxications aiguës par les pesticides avec 360 analyses chromatographiques reçues entre Janvier 2014 et Septembre 2020. La majorité des intoxications sont accidentelles spécialement chez les enfants. Ce résultat est trouvé par d'autres auteurs [84]. Pour les enfants de moins de 10 ans, le mauvais emplacement des produits domestiques et la non conscience des parents conduit malheureusement à l'intoxication. Dans les pays en développement, les enfants dans certains cas, sont obligés de travailler dans l'agriculture et cette exposition augment les possibilités d'intoxication.

Selon l'étude de Achour et al. [84], les femmes en tendance à commettre un suicide par les pesticides. Ce résultat concorde avec le nôtre, on a trouvé que 60% des demandes d'analyse sont auprès des femmes dont la plus part sont des intoxications volontaires.

Les insecticides sont la première famille de pesticides responsable des intoxications dans notre étude. Plusieurs études rétrospectives ont trouvé des résultats similaires [157]. Ces pesticides sont trouvés facilement dans le marché pour une utilisation domestiques dans les pays en développement. Les redonticides, les herbicides, et les fongicides sont aussi parmi les familles incriminées dans ces intoxications mais avec des pourcentages un peu moins fort.

Dans notre étude, l'alpha-chloralose est responsable de 33% des intoxications. Ce rendonticide est vendu à bas prix et il est toujours choisi pour les cas de suicide. Nos résultats sont comparables à ceux trouvés dans d'autres études [80], [158], [159].

La mesure de la cholinestérase guide le diagnostic aux intoxications par les Ops et les Cbt. Le dosage de l'AChE est plus fiable que BChE. Il existe une corrélation entre la diminution de la valeur de l'AChE et la sévérité de la situation neuromusculaire.

Cependant, la mesure de la BChE n'est pas constante car elle peut diminuer naturellement avec l'âge, le sexe, pendant la grossesse, ou avec certaines pathologies ou lors de la prise de médicaments. Pour l'Op, un dosage spécifique confirme que l'inhibition de la cholinestérase est due à l'exposition aux pesticides. Pour les carbamates, cette inhibition est réversible en 24 heures (sauf pour l'Aldicarbe) [160]. Il existe des similitudes dans la symptomatologie de l'intoxication par ces différentes familles de pesticides. Un syndrome muscarinique, un syndrome nicotinique et un syndrome central avec convulsions, coma et détresse respiratoire, sont observés pour les intoxications Op et Cbt avec des symptômes moins prononcés pour la Cbt. Les pyréthroïdes provoquent une ataxie et des convulsions. Dans cette situation, une mesure de la cholinestérase exclut la suspicion d'empoisonnement à l'Op ou à la Cbt. Pourtant, les méthodes séparatives décident quel est le composé incriminé. Il maintient un processus pour identifier le traitement spécifique du patient. Le traitement antidotique repose sur l'administration de sulfate d'atropine et de sulfate de pralidoxime méthyle pour OP et Cbt [160].

Le CAPM est le seul centre du pays contribuant dans le domaine toxicologique à adopter l'analyse chromatographique combinée. La chromatographie en phase gazeuse est recommandée pour l'analyse des pesticides volatiles. Le détecteur de la spectroscopie de masse effectue l'identification par la masse m/z du composé avec ses fragments et un temps de rétention est donné en fonction du programme de température. La chromatographie liquide facilite la séparation des composés thermolabiles, avec un solvant comme phase mobile. Pour cette technique, la spectrométrie de masse précise les MRM du composé en fonction de la bibliothèque et du temps de rétention (t_R). La combinaison de ces deux techniques de détection des pesticides, solidifie les résultats transmis à l'hôpital pour guider la prise en charge des patients. La confirmation est opérée par analyse chromatographique [147]. Cette analyse fournit des informations supplémentaires sur les autres molécules présentes dans les échantillons. La méthode multi-systématique utilisée dans ce travail, a détecté des pesticides dans des échantillons biologiques à l'aide d'une extraction liquide-

liquide chez 63 patients. L'alpha-chloralose a été détecté dans 21 cas, 4 cas seulement étaient orientés vers ce rodenticide et 7 cas n'avaient aucune indication sur la cause de l'empoisonnement. Pour les cas d'alpha-chloralose, l'analyse chromatographique a permis d'identifier la cause de l'empoisonnement. Cette constatation se retrouve dans d'autres études [161]–[163]. Néanmoins, les résultats négatifs sont liés à la cinétique des composés. Le temps du prélèvement n'a pas permis de détecter la molécule avant le métabolisme ou l'élimination.

Chapitre 2 : Exposition professionnelle aux pesticides chez les agents d'hygiène du BMH et chez les agriculteurs

1 Exposition professionnelle aux pesticides chez les agents d'hygiène du BMH

1.1 Les missions des Bureaux municipaux d'Hygiène (BMH)

Le bureau d'hygiène municipal (BMH) est un service technique de la commune, chargé de la veille sur l'état de propreté et de la salubrité de l'environnement de la population [164]. La notion du bureau d'hygiène a vu le jour au Maroc depuis l'année 1941, on compte 1503 communes dont 221 urbaines et 1282 rurales et le BMH est attribué à chaque commune du pays. Le BMH est chargé de la réalisation de plusieurs programmes, de plans d'action et de missions sur le terrain, à savoir :

La surveillance et le contrôle de l'hygiène tant intérieure qu'extérieure des établissements industriels et artisanaux, des ateliers et chantiers, ainsi que les conditions d'hygiène du personnel qui y est employé ; des lieux et des établissements publics, des centres à caractère social et de leurs personnels ; des établissements scolaires préscolaires et universitaires, des moyens de transport public et des moyens de transport sanitaires, ainsi que la surveillance sanitaire du personnel relevant de ces secteurs. Aussi, des cimetières, en assurant la supervision de leur entretien, et en donnant leur avis sur leur emplacement ;

La surveillance et le contrôle de la qualité des aliments, des boissons et des condiments destinés à la consommation (les restaurants, les unités de préparation des aliments, les centres commerciaux, les fours, les souks hebdomadaires...).

Le contrôle et la surveillance de la salubrité de la voirie, des égouts et des points d'eau ainsi que de la gestion des déchets liquides et solides ; S'assurer de la bonne qualité de l'eau de boisson pour la population est l'affaire du bureau d'hygiène pour les habitations non jointes aux réseaux publics.

La lutte contre les vecteurs des maladies. Grace à l'action 3 D (désinfection, désinsectisation et dératisation). La désinsectisation débute par le recensement des gîtes et les points de collecte d'eau dès l'arrêt des précipitations. Le recensement permet de dresser un plan d'action adapté à chaque gîte ; basé soit sur le traitement physique par le comblement, le

drainage ou le pompage, soit le traitement biologique par l'ensemencement du *Gambusias* ou le traitement chimique par des larvicides ou des insecticides.

La lutte contre les rongeurs se fait le long de l'année et aussi à la demande de la population et dans les lieux où ils peuvent coexister tel les abattoirs, les lieux de stockages des aliments : les cantines, les restaurants, les moulins, les fours,...

L'activité médico-légale : le médecin du Bureau d'hygiène est appelé chaque fois qu'il y'a un décès pour deux choses : la première c'est pour s'assurer que la mort a eu bien lieu et donc confirmé le décès. La deuxième c'est de s'assurer de la nature de la mort qui peut être naturelle ou suspecte.

Ainsi, le BMH à Rabat se compose de plusieurs services [165] , on trouve : Le service d'hygiène alimentaire ; le service de salubrité publique ; le service médico-social ; le service médico-légal ; le service de lutte anti-vectorielle ; le service de ramassage des chiens et chats errants ; Antennes d'hygiène au niveau des cinq arrondissements urbains et Laboratoire.

Le service de lutte anti-vectorielle est chargé de lutter contre les vecteurs de maladies particulièrement les insectes (moustiques, mouches, cafards, ...) et les rongeurs (rats et souris) par l'utilisation des pesticides dans une grande partie des missions.

1.2 La région Raba-Salé-Kenitra (RSK)

Il existe plusieurs BMH au niveau de la région Rabat-Salé-Kénitra, on compte 114 communes dont 23 urbaines et 91 rurales [166] . Analogiquement, on parle de 114 BCH dans la région. Notre étude a été effectuée au niveau de 4 BCHs, à savoir BCH de Rabat, BCH de Temara, BCH de Kénita et BCH de Skhirat-Sebbah.

Plusieurs tentatives ont été menées pour avoir l'accord du BCH Salé et BCH Khmissat pour faire partie de cette étude mais malheureusement elles n'ont pas réussies.

1.3 L'étude exploratoire

Nous avons mené une étude prospective chez les travailleurs des BMHs de la région de RSK afin d'évaluer leur exposition aux pesticides. Cette étude a eu l'accord du comité d'éthique pour la Recherche Biomédicale d'Oujda (CERBO) classé en numéro d'ordre 14/2019 (Annexe 1).

Cette étude exploratoire, a pour but d'étudier les caractéristiques épidémiologiques des travailleurs des BMHs, de mettre en évidence la présence de signes et symptômes d'intoxication, de mesurer l'activité cholinestérasique dans le sang total et de réaliser un screening large des pesticides dans les échantillons urinaires par méthodes

chromatographiques (LC-MS/MS et GC-MS) au laboratoire du CAPM. Une fiche d'enquête (Annexe 2) a été préparée pour la collecte des données chez les travailleurs.

1.3.1 Description de la population à l'étude

Tous les sujets de l'enquête ont eu un consentement écrit en Arabe (annexe 3) ou en Français (annexe 4) à leur service avec la fiche d'information aussi en deux langues (Annexe 5 et 6). Notre population est composée de tous les agents d'hygiène qui manipulent les pesticides ou qui travaillent au voisinage du lieu de stockage, âgés de 18 ans et plus, qui sont affiliés aux BCHs et ayant signés le consentement éclairé (Critères d'inclusion). Les travailleurs ayant refusé le consentement éclairé ne sont pas inclus dans cette étude (Critères de non-inclusion).

1.3.2 Recrutement des agents consentants

Le recrutement s'est fait pendant la période de l'étude au niveau de l'infirmerie des BMHs selon un calendrier préétabli entre le médecin chef du BMH et les investigateurs. La fiche d'enquête (annexe 2) à remplir est en rapport avec les caractéristiques épidémiologiques des agents à savoir ; l'Age, le sexe, le poids, la taille, l'origine géographique et ethnique, la nationalité de l'agent d'hygiène. Aussi l'adresse de résidence afin de localiser sa position par rapport aux unités de production de pesticides ou bien des zones agricoles.

L'agent est aussi questionné quant aux antécédents médicaux et chirurgicaux notamment hépatiques, les pathologies intercurrentes (diabète, insuffisance rénale, VIH, ... etc.) avec le traitement associé. Les habitudes tabagiques (nombre paquets par jours/ depuis combien d'année), la consommation d'alcool et l'usage d'autres drogues sont aussi communiqués.

Dans une autre partie, la fiche pointe les informations en relations avec l'exposition aux pesticides, on demandant la description du poste (Durée de contact, Rythme de contact (par jour, par semaine, par mois), nature et composition des pesticides). Les signes d'intoxication que cela soit les signes cliniques (irritation muqueuses oculaire, buccale, nasal) ou signes neurologiques (fourmillement, engourdissement, fatigue, céphalées, troubles de sommeil, trouble de l'équilibre). Les agents sont aussi renseignés sur le port d'équipements de protection personnels (EPP) par la présence ou l'absence de masque, des gants, de la blouse, de combinaison lors de la manipulation des pesticides. De même, les agents rapportent sur les moyens de prévention à savoir, prendre une douche après utilisation, changement des habits ou la garde des mêmes vêtements en dehors du lieu de travail.

Autres informations sont recensées en relation avec les aliments consommés, ou exercice d'une autre profession (contact avec des métaux lourds, ou autres pesticides).

1.3.3 Méthode de prélèvement et conservation

A la fin de l'enquête, l'infirmier(e) procède aux prélèvements sanguins des travailleurs. Quatorze millilitres de sang sont prélevés au niveau de la veine brachiale. Les prélèvements d'urine excèdent les dix millilitres. Tous les échantillons sont datés du jour du prélèvement et l'identification du travailleur, stockés dans un sac isotherme à 4°C et transportés au CAPM-LAB pour analyse. La chaîne du froid est strictement maintenue durant le transport. Le prélèvement de sang total est utilisé pour la quantification de l'activité cholinestérasique érythrocytaire et plasmatique. Le plasma et les urines sont conservés à -20°C jusqu'à l'analyse chromatographique.

1.3.4 Mesure de l'activité cholinestérasique

La mesure de l'activité a été réalisée avec le ChE Check Mobile. Une étude de l'intensité de liaison qui peut exister entre l'activité cholinestérasique et l'âge ou la masse corporelle est faite par le calcul du coefficient de corrélation R ($-1 < R < 1$). Si une corrélation existe, le coefficient doit être proche de 1 ou -1, si non si le coefficient est proche de zéro, la corrélation est absente.

1.3.5 Analyse chromatographique

Les échantillons urinaires ont subi un screening large par GC-MS et LC-MS/MS après l'extraction liquide-liquide du CAPM-LAB. Une recherche ciblée est faite par la suite pour la recherche des pesticides utilisés par les travailleurs.

1.3.6 Analyse des données

Pour la GC-MS, l'analyse des données est faite avec le logiciel TurboMass® version 6.0 et la bibliothèque NIST version 2008. Le logiciel permet de donner le niveau de concordance entre le spectre de masse trouvé et les données enregistrées dans la bibliothèque.

La lecture des résultats de la LC-MS/MS est faite par le logiciel Analyst®1.6.2 version 2013, à l'aide des MRMs de chaque molécule, le temps de rétention et aussi la recherche dans la bibliothèque. L'interprétation des résultats se fait à l'aide de la GC-MS et de la LC-MS/MS par une confirmation des pics chromatographiques. Toutes les données recueillies seront saisies sur Excel, pour une analyse statistique, descriptive et analytique.

1.4 Résultats

1.4.1 Population

Cette étude a recruté 54 agents d'hygiène (avec une dizaine d'agent ayant refusé de participer à l'étude pour des raisons personnelles). Il s'agit de 54 travailleurs qui ont fait cette analyse pour la première fois. On compte 76% des agents d'une tranche d'âge entre 45 et 60 ans. 53 sujets étaient de sexe masculin. L'âge moyen 45 ± 8 ans et un indice de masse corporelle de $25,36 \pm 3,87$ kg/m².

1.4.2 Mesure de l'activité cholinestérasique

Toutes les mesures de l'activité sont normales (Tableau15). Toutes les valeurs sont dans l'intervalle de mesure (AChE 33.0-49.4 U/gHb et BChE 1623-3861 U/L) (Figure 36 et 37). La charte montre que toutes les valeurs sont supérieures à la limite inférieure du ChE Check. Les valeurs qui sont hors la limite supérieure indiquent une augmentation au niveau d'hémoglobine généralement.

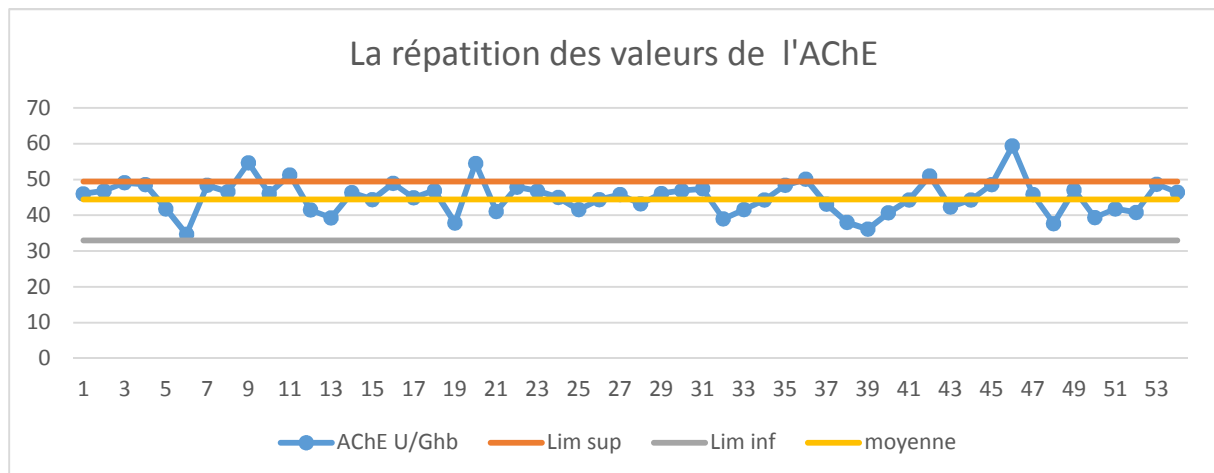


Figure 29: La répartition des valeurs de l'AChE

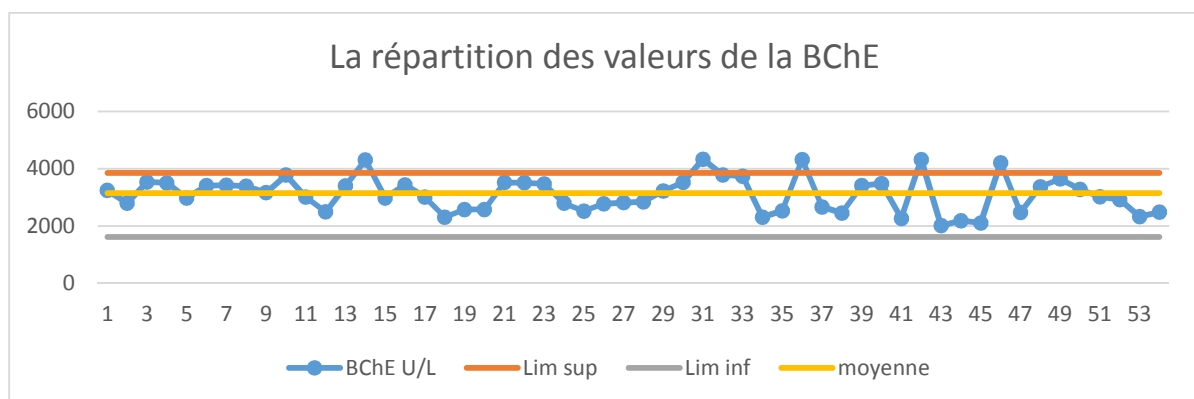


Figure 30: La répartition des valeurs de la BChE

Tableau 14: Résultats de l'activité cholinestérasique (AChE et BChE)

N°	AChE U/Ghb	BChE U/L	Age	Poids	Taille	Durée De Contact	BMHs
<i>1</i>	46,0	3243,6	53	51	1,66	33	Rabat
<i>2</i>	46,8	2804,7	54	68	1,63	17	Rabat
<i>3</i>	49,1	3544	60	80	1,68	17	Rabat
<i>4</i>	48,6	3510,2	48	90	1,80	12	Rabat
<i>5</i>	41,8	2983,1	43	64	1,68	20	Rabat
<i>6</i>	34,7	3412,6	45	78	1,72	20	Rabat
<i>7</i>	48,4	3428	60	72	1,61	18	Rabat
<i>8</i>	46,6	3393,5	57	56	1,63	19	Rabat
<i>9</i>	54,7	3166,3	54	65	1,68	24	Rabat
<i>10</i>	46,1	3781,6	46	90	1,76	20	Rabat
<i>11</i>	51,3	3012,4	43	58	1,68	13	Rabat
<i>12</i>	41,5	2500,2	54	80	1,71	35	Rabat
<i>13</i>	39,3	3401,3	42	78	1,75	18	Rabat
<i>14</i>	46,3	4307,1	49	78	1,70	10	Rabat
<i>15</i>	44,4	2982,1	40	80	1,76	1	Rabat
<i>16</i>	48,9	3442,8	47	64	1,70	5	Rabat
<i>17</i>	44,9	3013,8	52	70	1,75	25	Rabat
<i>18</i>	46,9	2311,3	53	80	1,80	25	Rabat
<i>19</i>	37,8	2583,1	58	71	1,65	35	Rabat
<i>20</i>	54,5	2583,1	58	70	1,81	25	Rabat
<i>21</i>	41,1	3525,8	49	65	1,67	5	Rabat
<i>22</i>	47,9	3513,1	57	65	1,60	18	Rabat
<i>23</i>	46,8	3474,6	53	66	1,82	29	Rabat
<i>24</i>	45,0	2799,9	52	88	1,60	30	Rabat

25	41,6	2525,2	54	64	1,70	36	Rabat
26	44,4	2780,3	60	58	1,67	29	Rabat
27	45,8	2822,8	39	75	1,70	20	Rabat
28	43,2	2847,6	57	85	1,75	20	Temara
29	46,1	3231,2	53	59	1,55	9	Temara
30	46,9	3523,3	51	76	1,70	11	Temara
31	47,4	4333,9	57	55	1,60	7	Temara
32	39,0	3789,5	47	76	1,75	11	Temara
33	41,6	3743	50	75	1,63	11	Temara
34	44,3	2311,1	54	80	1,70	2	Temara
35	48,4	2537,8	45	82	1,71	26	Temara
36	50,1	4325,6	46	69	1,63	19	Temara
37	43,1	2672,1	43	60	1,61	5	Temara
38	38,0	2456,6	49	75	1,71	32	Temara
39	36,1	3415,2	51	65	1,65	29	Temara
40	40,7	3485,3	54	80	1,55	23	Temara
41	44,3	2266,4	24	70	1,71	12	Kenitra
42	51,0	4325,2	43	64	1,60	11	Kenitra
43	4,3	2016	54	87	1,73	13	Kenitra
44	44,3	2188,7	50	76	1,74	1	Kenitra
45	48,6	2113,1	52	70	1,80	4	Kenitra
46	59,4	4212	59	56	1,72	8	Kenitra
47	45,8	2477,6	47	108	1,72	13	Kenitra
48	37,7	3373,4	42	74	1,60	8	Kenitra
49	47,1	3650	56	62	1,36	3	Skhirat Sebbah
50	39,4	3285,8	40	74	1,72	7	Skhirat Sebbah

51	41,8	3020,5	40	92	1,76	10	Skhirat Sebbah
52	40,8	2926,9	42	80	1,76	10	Skhirat Sebbah
53	48,7	1336,7	56	48	1,61	28	Skhirat Sebbah
54	46,4	2484,7	20	55	1,60	3	Skhirat Sebbah
<i>Moyennes</i>	44,4	3151,8		72	1,68		
<i>Ecart type</i>	7,3	647,8					
<i>Maximum</i>			60			36	
<i>Minimum</i>			39			1	

1.4.3 Questionnaire

Depuis les 54 questionnaires remplis, 28% des travailleurs sont analphabètes et 93% sont mariés dont 83% ont des enfants. Avec 54% ont des habitudes tabagiques. (Tableau16)

93% des ouvriers ont répondu qu'ils n'ont pas d'antécédents médicaux et 63% d'eux consomment les fruits et légumes plus de 3 fois par semaine.

Pour leur exposition aux pesticides, 81% des travailleurs ont déclarés avoir utilisé des pesticides dans leurs domiciles, avec quelques cas ayant mentionné le fait d'avoir utilisé des produits de leurs postes de travail. Plus que la moitié (62%) des travailleurs utilisent au moins un moyen de protection lors de la manipulation des pesticides.

Alors que 53% ont affirmé qu'ils n'ont jamais eu de signes neurologiques ou cliniques après leur utilisation de ces produits.

Le questionnaire n'a révélé aucun cas d'intoxication précédente par les pesticides, mais la moitié des agents ont déclaré avoir des irritations de la peau au moins une fois dans leur carrière professionnelle. Les irritations muqueuses étaient moins fréquentes chez cette population, il s'agit de 37% seulement des réponses. Alors que 41% des travailleurs souffraient d'au moins d'un signe neurologique (Eg. Céphalée, trouble de sommeil, fatigue). La durée d'exposition à ces pesticides est entre 1 an et 36 ans avec une moyenne de 5 heures d'exposition par jour.

Les agents consentants résident dans des zones urbaines et 56% consomment des fruits et des légumes plus de 5 fois par semaine. Et plus de la moitié sont des fumeurs (54%) avec une durée de consommation de 24 ans de moyenne. 13% sont diabétiques.

61% déclarent avoir utilisé trois équipements personnels de protection, à savoir, la blouse, les gants et le masque. Presque la totalité des agents lavent leurs mains après manipulation des pesticides à leur poste de travail (Figure 38), d'ailleurs 65% d'eux sont informés des modalités de protection lors de l'utilisation selon les questionnaires.

Il n'existe aucune corrélation entre l'activité cholinérasique et l'âge ($R_{AChE} = +0,09$, $R_{BChE} = +0,08$) ni avec la masse corporelle ($R_{AChE} = +0,26$, $R_{BChE} = +0,05$). Ceci est illustré dans les figures 39 et 40.

Des corrélations entre les perturbations médicales et le tabagisme ainsi qu'entre l'utilisation des équipements de protection personnels sont faites. Elles étaient statistiquement non significatives.

Les pesticides utilisés par les agents sont presque les mêmes pour tous les BMHs vu que l'approvisionnement central se fait par le ministère de l'intérieur. Il s'agit de la famille des pyréthrénoïdes (Deltaméthrine, Bifenthrine, Permethrine, Cyperméthrine, Tetraméthrine, Esbiothrine) et des organophosphorés (Téméphos).

Tableau 15: Caractères sociaux et démographiques des agents d'hygiène (N = 54).

Paramètres	Nombre des participants	Pourcentage
Age	45 ± 8 ans	
Poids	71,8 ± 11,6 Kg	
Taille	1,68 ± 0.1 m	
Sexe		
Masculin	53	98%
Féminin	1	2%
Education		
Analphabète	15	28 %
Primaire	20	37%
Secondaire	17	31.5%
Universitaire	2	2.5%
Situation familiale		
Marié	48	89 %
Célibataire	6	11 %
Durée de contact avec les pesticides		
Moins de 5 ans	5	9%

5 ans -15 ans	21	39 %
15ans – 30 ans	23	43%
Plus de 30 ans	5	9%
Habitudes tabagiques		
Fumeurs	29	54%
Non-fumeurs	25	46%

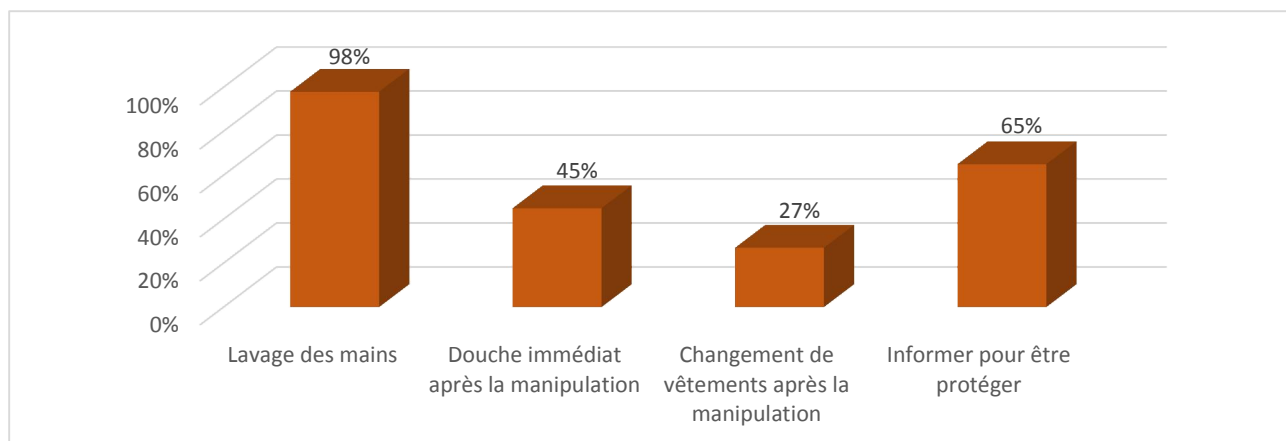


Figure 31: Répartition par pourcentage des actions préventives chez les travailleurs après exposition aux pesticides

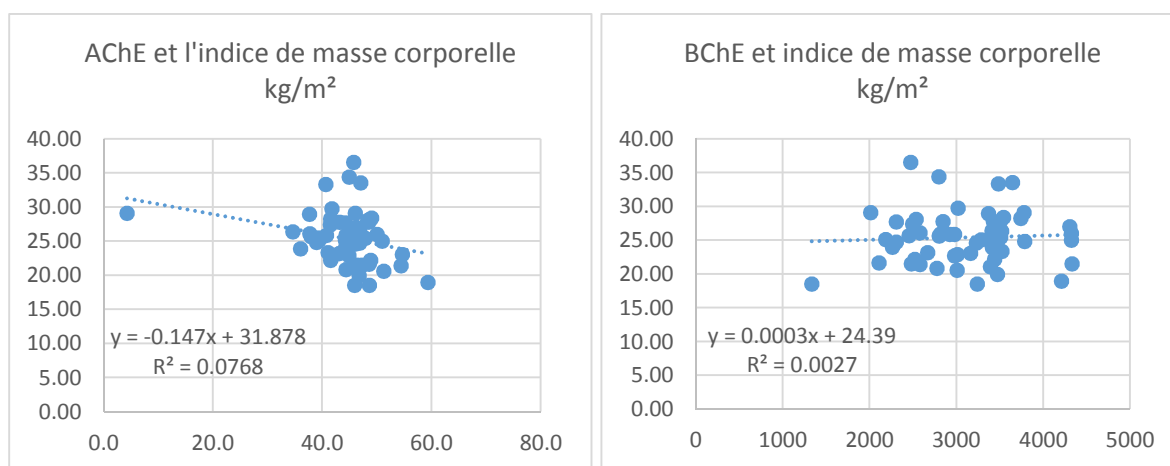


Figure 32: Courbes de corrélation de l'AChE et BChE et l'indice de masse corporelle.

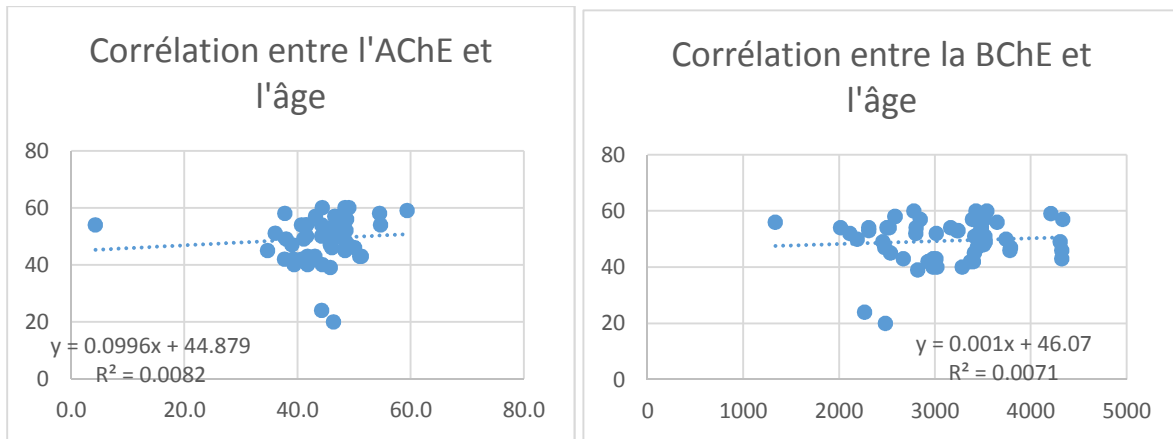


Figure 33: Courbes de corrélacion de l'AChE et BChE et l'âge.

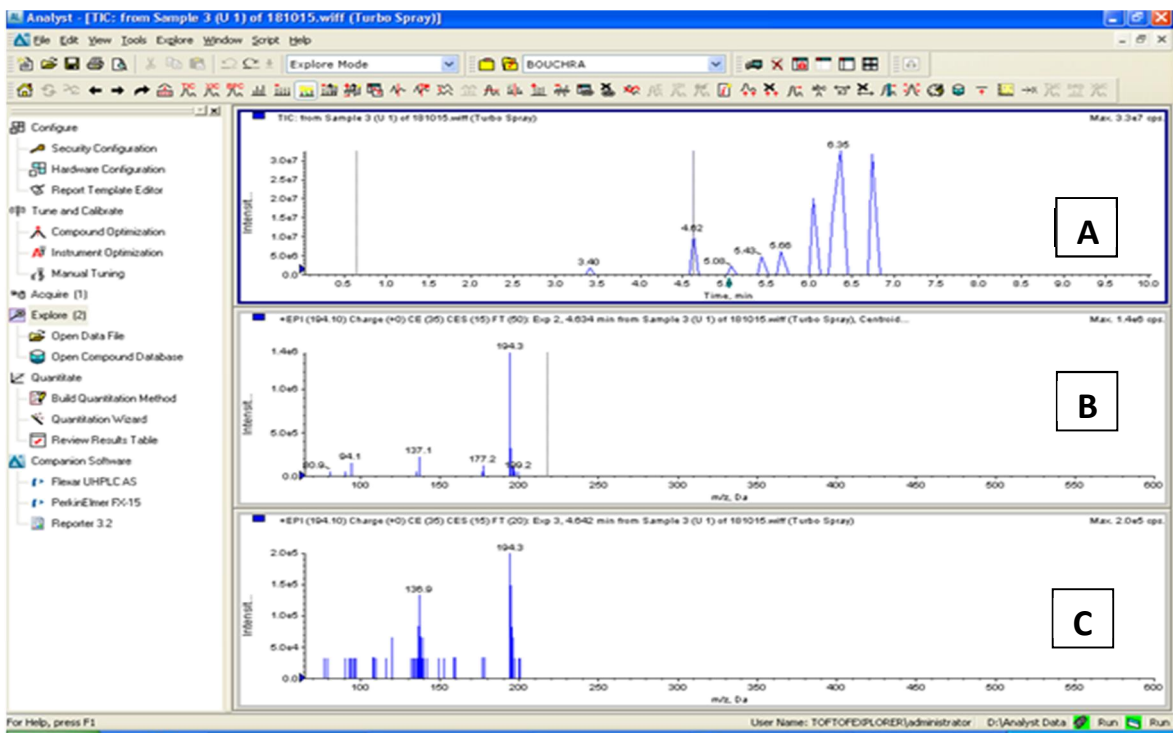


Figure 34: Le signal TIC du prélèvement par la LC-MS/MS, A. B et C les spectres de masse du signal à 4.62 min

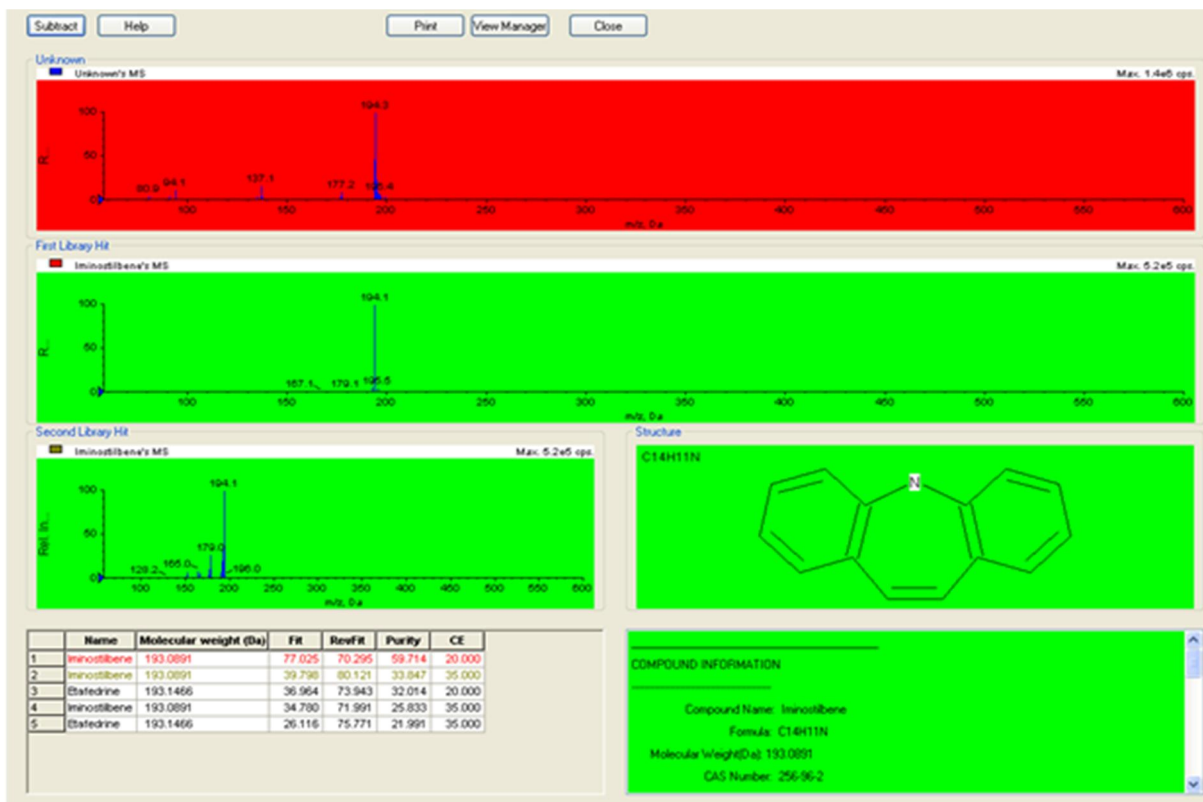


Figure 35: La correspondance du spectre de masse à la bibliothèque de base de données de la LC-MS/MS

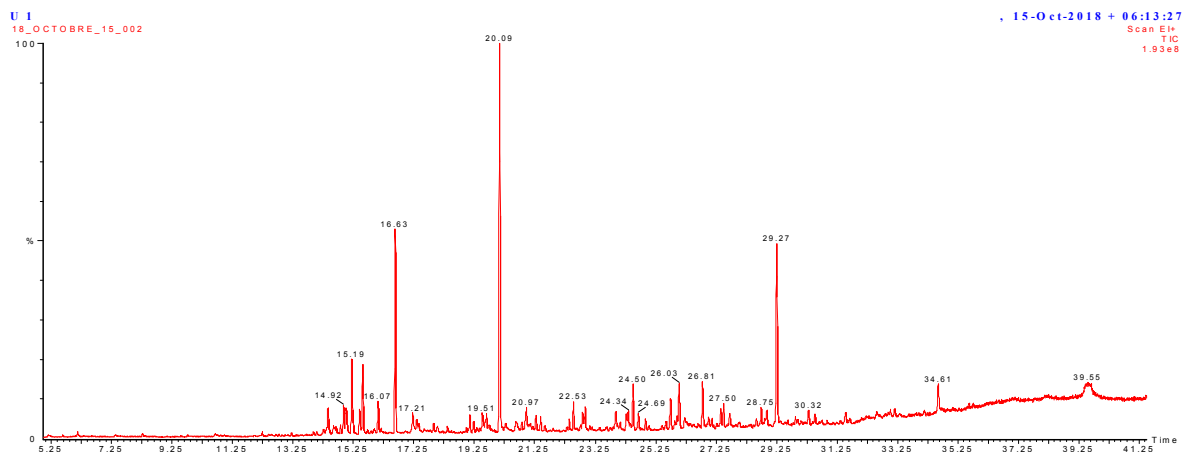


Figure 36: Chromatogramme du prélèvement du premier agent par GC-MS

2 Exposition professionnelle aux pesticides chez les agriculteurs marocains

L'exposition professionnelle chez les agriculteurs marocains est peu documentée. Mais, la consommation des pesticides dans les régions agricoles demeure importante.

2.1 Méthodes

En Avril 2019, le CAPM a participé au Salon International d'Agriculture à Meknès (SIAM)

pour la sensibilisation aux bonnes pratiques d'utilisation des pesticides et les attitudes à prendre lors d'une intoxication.

Une équipe du CAPM-LAB s'est déplacée au SIAM pendant 4 jours afin de proposer des analyses rapides d'activité cholinestérasique sur place. Une analyse des urines est aussi proposée pour les agriculteurs visiteurs du stand du CAPM.

De plus trois agriculteurs volontaires de la région de Kenitra ont accepté de faire une analyse toxicologique des pesticides.

2.1.1 Recrutement des agriculteurs

Tous les visiteurs du stand ont été sensibilisés pour l'utilisation des pesticides. Une analyse rapide de l'activité est proposée avec une analyse urinaire.

Pour les agriculteurs volontaires, le recrutement s'est fait en Mars 2019 au niveau des champs de culture en propriété des agriculteurs participants. On s'est déplacé avec une infirmière pour assurer les prélèvements sanguins.

2.1.2 Questionnaire

Des questions précises ont été adressées aux participants en relation avec ; la date de la première et de la dernière utilisation des pesticides, la présence d'une intoxication antérieure avec les pesticides et les noms des molécules utilisées.

2.1.3 Prélèvement

Les prélèvements urinaires des agriculteurs qui ont acceptés de faire l'analyse sont acheminés vers le laboratoire du CAPM à Rabat chaque jour. Chaque prélèvement est identifié avec la date et le numéro. Un sac isotherme est utilisé pour maintenir la température des échantillons. Au niveau du laboratoire, les urines sont maintenues à une température de -20°C jusqu'à l'analyse chromatographique.

2.1.4 Activité cholinestérasique et analyse chromatographique

La mesure de l'activité a été faite par le ChE Check Mobile sur place. Les urines sont analysées par GC-MS et LC-MS/MS selon les mêmes méthodes d'extraction et de détection utilisées pour les agents d'hygiène.

2.2 Résultats

Il s'agit d'une étude exploratoire auprès des manipulateurs de pesticides de différentes régions marocaine. L'objectif est de connaître les molécules utilisées et la durée de contact

de ces pesticides. La mesure de l'activité cholinestérasique est réalisée sur le sang total. L'analyse chromatographique était faite sur les urines par une recherche large par GC-MS et LC-MS/MS, après une extraction liquide-liquide.

L'investigation a recruté 28 participants. L'âge varie de 19 à 63 ans avec une moyenne est $44,25 \pm 12,33$ ans.

Les participants affirment des durées de contact avec les pesticides qui varient entre 2 ans et 30 ans. D'ailleurs, 4 participants ont évoqué qu'ils ont été intoxiqués lors de l'utilisation des pesticides. Des intoxications aiguës avec perte de conscience qui a nécessité une intervention hospitalière. Avec 18% des agriculteurs qui ont remarqué des signes cliniques et neurologiques (Fatigue, vertige, irritation oculaire et olfactive). Ceci ce confirment, car 96,5% des participants n'utilisent aucuns de moyens de protection lors de la manipulation des pesticides. Pourtant, 88% ont révélé qu'ils lavent leurs mains après l'utilisation de ces molécules. Pour l'approvisionnement de ces produits, 90% des participants s'approvisionnent on s'intéressant à l'effet sur leur problème rencontré dans les champs sans se soucier de la toxicité des produits.

Avec 28 mesures de l'activité cholinestérasique et 23 analyses chromatographiques, les valeurs de l'activité cholinestérasique sont dans l'intervalle acceptable (Tableau 17). La moyenne des AChEs est de l'ordre de $44,15 \pm 4,03$ U/gHb et la BChE est égal à $2968,51 \pm 947,66$ U/L. Une corrélation entre l'AChE et la BChE, la durée et l'âge est faite.

Les coefficients de corrélation entre la durée de contact et l'AChE et la BChE sont respectivement ; 0,096 et -0,205. Pour l'âge, les coefficients de corrélations entre l'AChE et la BChE sont 0,137 et -0,076 (Figure 37 et 38). Une corrélation négative entre deux variables indique que les valeurs d'une variable tendent à augmenter lorsque celles de l'autre variable diminuent. On la représente par un coefficient de corrélation négative.

Pour le screening large des urines des agriculteurs, aucunes molécules de pesticide n'ont été détectées soit par la GC-MS ou bien par la LC-MS/MS.

Tableau 16: Résultats des BChE et AChE

N°	AChE	BChE	Age	Durée de contact	Analyse chromatographique
1	47,5	2625	19	7	Négatif
2	46,6	3224,5	18	8	Négatif
3	42,8	2895	35	21	Négatif
4	42,2	6631	41	8	Négatif

5	51,6	3374,7	63	4	Négatif
6	42,5	3003,3	32	18	Négatif
7	41,6	2792,4	25	16	Négatif
8	42,5	2261,4	62	7	Négatif
9	42,3	2077,2	63	6	Négatif
10	46,4	1661,9	61	20	Négatif
11	45	2031,4	52	20	Négatif
12	45,3	4637,8	53	19	Négatif
13	49,7	2779,9	50	30	Négatif
14	42	3101,9	51	2	Négatif
15	44,9	2368,7	35	27	Négatif
16	38,6	3223,6	47	30	Négatif
17	38,2	2873,5	32	12	Négatif
18	43,2	3024,7	53	2	Négatif
19	48	2459,6	50	29	Négatif
20	43,4	3311,9	40	20	Négatif
21	44,2	4140	53	3	Négatif
22	41,7	3163,7	52	15	Négatif
23	37,4	2681,8	42	12	Négatif
24	40,9	2478	46	7	Négatif
25	54,8	2292,6	49	15	Négatif
26	39,9	3200,9	40	20	Négatif
27	49,3	2514,4	38	20	Négatif
28	43,8	2287,6	37	15	Négatif
Moyennes	44,15	2968,51	44,25		

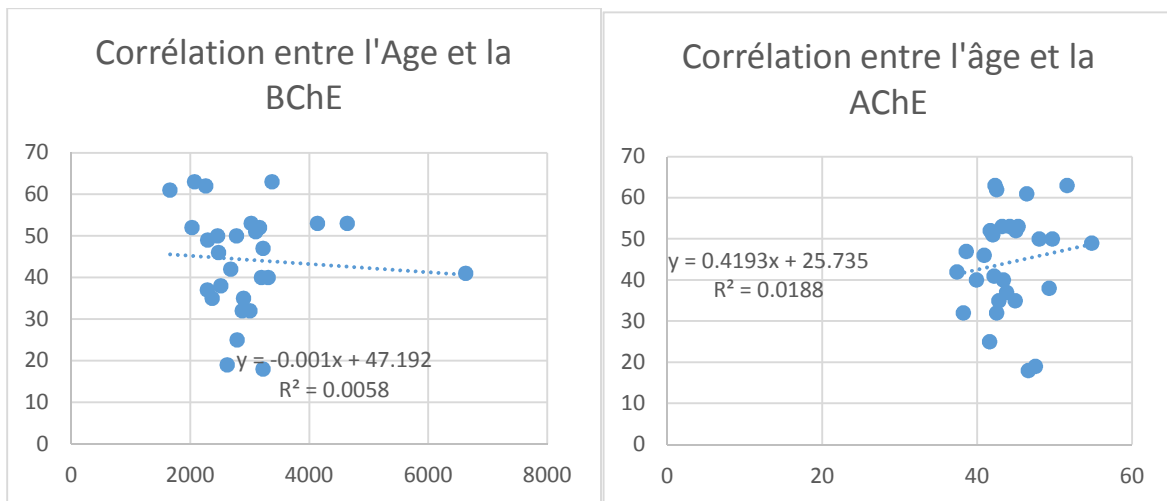


Figure 37: Courbes de corrélation de l'AChE et BChE et l'âge.

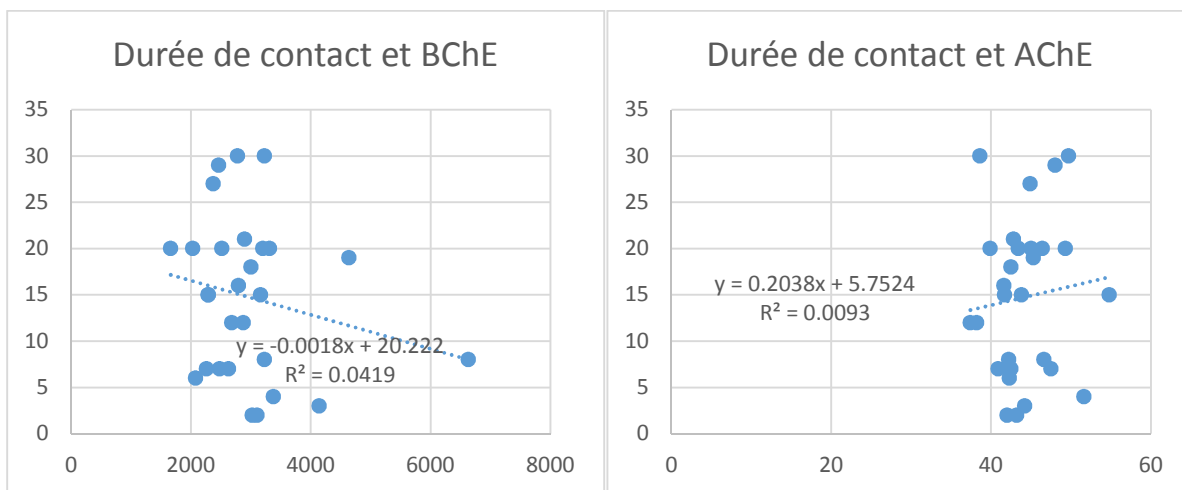


Figure 38: Courbes de corrélation de l'AChE et BChE et la durée de contact.

Tableau 17: Résultats statistique des BChE et AChE

Paramètres	Statistiques	Valeurs
Age	N	28
	Moyenne	44.25
	Max	63
	Min	18
Durée de contact	Moyenne	14.75
	Ecart type	8.54
	Max	30
	Min	2
AChE	Moyenne	44.15

	Ecart type	4.03
	Max	54.80
	Min	37.40
BChE	Moyenne	2968.51
	Ecart type	947.66
	Max	6631.00
	Min	1661.90

2.3 Discussion

La surveillance biologique est l'un des éléments d'une stratégie globale de contrôle des risques des toxiques au lieu de travail et en principe cette surveillance est plus proche de la surveillance environnementale que de la surveillance de la santé [167]. Les organophosphorés et les carbamates comme inhibiteurs de la cholinestérase suscitent beaucoup d'intérêt dans le monde. En effet, la mesure de l'activité cholinestérase est toujours liée à des intoxications aux insecticides [15]. Il s'en suit de dire que, la mesure de l'activité cholinestérasique est très importante pour des décisions en analyses toxicologiques et spécifiquement les analyses rapides.

Le laboratoire du CAPM reçoit des demandes d'analyses similaires pour des cas chez qui il y a des soupçons d'intoxication par les pesticides. Les résultats retrouvés sont dans la même marge chez les patients non intoxiqués par les pesticides.

Notre surveillance, parmi les rares études dans cette optique, impliquait 54 agents qui étaient directement exposés régulièrement aux pesticides.

Plusieurs études se sont intéressées à la mesure de l'activité cholinestérasique comme biomarqueur d'exposition aux pesticides. Des résultats positifs sont notifiés chez des patients intoxiqués par les organophosphorés et les carbamates depuis l'hôpital général en Sri Lanka, après la mesure de l'activité ACE et BChE [168].

Dans cette optique, une étude faite sur 387 jeunes en bonne santé, par la mesure de l'activité cholinestérasique, n'a enregistré aucun effet significatif de l'âge sur l'activité cholinestérasique. De même, aucune corrélation n'est donnée entre le tabagisme et la BChE [169].

Il est important de savoir la rangée normale de l'activité ACHE pour la surveillance d'exposition aux pesticides. Pour cette raison Arrieta, 2009 et al. ont mesuré cette activité chez 991 individus [170].

Quelques études se sont intéressées à la surveillance de l'exposition aux pesticides chez une population marocaine, soit par la mesure de l'activité cholinestérasique et questionnaire et l'examen Clinique [25], [27], ou par une enquête par questionnaire seulement chez les agriculteurs [14] ou une population rurale [171] Il existe aussi des recherches entamées pour la détection des pesticides dans des matrices biologiques humaines par GC-MS [26]

El Kettani et al. [25], ont évalué l'exposition aux pesticides chez 325 sujets et aucune diminution de l'activité n'a été observé. L'auteur explique ses résultats par l'utilisation minimale des pesticides chez la population étudiée.

Il existe une grande confusion d'interprétation des mesures de l'activité cholinestérasique. Il est a noté que la BChE est le biomarqueur le plus sensible d'une intoxication mais ne donne pas vraiment une idée sur la sévérité de l'intoxication comme le fait la AChE [169]. Selon Karasova et al., [169], la méthode Ellman à des limites particulièrement cause des interférences de l'hémoglobine de l'individu.

Dans cette visée, une étude faite pour la corrélation entre le test mobile Check et la spectrométrie et le système test-mate [168], indique que le système test mobile check mesure l'activité de façon très rapide mais donne toujours des résultats supérieurs à ceux des deux autres méthodes. On peut donc penser que les valeurs vraies chez les travailleurs sont inférieures à ceux trouvées. Pourtant, un résultat négatif peut être expliqué par une faible exposition ou un retard de la mesure [170].

Il est important de signaler que le comportement des mesures de l'AChE et la BChE pour une intoxication aiguë est différent de celle chronique. Pour une intoxication aiguë, la mesure de l'activité diminue. Alors que lors d'un bio-monitoring professionnel, l'AChE peut montrer une variation de l'ordre de 0.1 entre les individus et la BChE peut changer d'un individu à un autre et même chez le même individu [25].

Il faut prendre en considération que l'activité des cholinestérases peut aussi diminué en cas de malnutrition, d'anémie, de prise de certains médicaments... etc [172]. Initialement on prévoyait une diminution de la valeur de l'activité chez les agents nouveaux dans le service de pulvérisation. Mais ces prévisions ne sont pas confirmées.

D'ailleurs, il est à noter que l'organisme développe une compensation des valeurs de l'activité cholinestérasique afin de les aligner aux valeurs normales pendant la durée d'exposition [173].

Communément, l'évaluation de l'activité s'obtient par en minimum deux dosages séparés par 3 jours, de telle façon à visualiser la diminution [25]. Dans notre cas, on ne dispose que d'une seule mesure. La conclusion du bio-monitoring s'est renforcée par l'examen clinique et l'analyse urinaire par chromatographie.

D'ailleurs, la gravité des troubles liés à une intoxication n'est pas toujours corrélée avec une valeur d'activité cholinestérasique diminuée [174].

Une étude antérieure portant sur la mesure de l'activité de l'AChE, chez des sujets âgés de 18 à 72 ans, a suggéré que l'association avec l'âge est peu susceptible d'être cliniquement significative [170], chose qui est vérifiée dans notre étude également.

Il est conformément stricte de respecter les règles consignes de pulvérisation des pesticides, par l'utilisation des équipements de protection personnels PPE (les gants, la blouse, les bottes, le masque protecteur, ou à défaut le chapeau et les lunettes). Des formations sont toujours nécessaires auprès des utilisateurs de ces molécules [175]. En effet, une enquête a été conduite auprès de 74 producteurs de menthe dans la Wilaya de Meknès-Tafilalt [171], a montré l'absence d'utilisation de moyens de protection chez les agriculteurs.

Pour Berni et al. [14], la majorité des 402 manipulateurs de pesticides questionnés avaient des irritations de la peau après application des pesticides, des bouffés de chaleurs et de froid et même certains évoquent avoir des problèmes respiratoires et des allergies. Ceci est analogue aux résultats trouvés dans notre investigation.

Toutefois, dans notre étude la majorité des participants n'ayant aucun signe de perturbation biologique n'ont jamais fait des examens dans ce sens.

La recherche des pyréthroides dans le sang par la GC-MS a suscité l'intérêt de certains chercheurs [27], [176], [177]. Pourtant aucunes de ces études n'a enregistré la présence de ces molécules chez des villageois [177] ou même chez des agents d'hygiène [27].

Hayat et al., [209] se sont penchés sur l'analyse de 27 échantillons de sang pour la recherche de 383 pesticides par GC-MS. Ils ont détecté le chlorpyrifos et le pyributicarbe sans aucune détection des pyréthroides.

Ramesh et Ravi, en 2004 [177], cherchait de détecter 13 pyréthrines dans le sang total de 45 villageois en Pakistan par GC-M. Mais aucunes molécules n'a été détectées.

Le screening large par GC-MS, de 60 prélèvements urinaires et de sang est réalisé par El Ouedghiri et al., [178]. Cette analyse n'a donné aucune détection de pesticides chez des agents d'hygiène. Une similarité avec nos résultats.

La recherche des pesticides par GC-MS chez des patients du service endocrine au Maroc, a montré la contamination par le diméthoate et le bifenthrin. Même si les patients n'ont pas indiqués une exposition aux pesticides [26].

Selon Ramesh et al. [177] la non-détection est due à l'excrétion rapide du résidu ou à des limites techniques et méthodiques qui doivent être revu. D'ailleurs, Versace et al [179] a évoqué qu'une identification peut échouer pour la GC-MS si les concentrations sont trop basses pour le système analytique.

Malgré la non-sévérité des pyréthroides, cela n'exclue en aucun cas le besoin d'un examen clinique régulier chez cette population ainsi que des mesures d'activités périodiques pour le constat de variabilité. Il est d'autant plus important de œuvrer pour le développement de méthode analytique adéquate et ciblée, et aussi l'utilisation d'une technicité qui peut détecter des concentrations corrélés une intoxication chronique.

En effet, une recherche de métabolite est à envisager pour une surveillance biologique dans les urines chez les personnes exposées continuellement aux pesticides. De plus, la surveillance et la sensibilisation est toujours nécessaire auprès de la population cible.

Conclusion

L'exposition humaine aux pesticides est aussi fréquente pour les professionnels en contact régulier avec ces molécules, que la population générale. D'ailleurs, ces populations sont très peu représentées dans les études de surveillance biologique de l'exposition au pesticide au Maroc. Nos études sont parmi les premières investigations marocaines dans ce sens.

Dans notre travail on a pu élaborer une méthode d'optimisation de détection de 15 molécules de pesticide (Aldicarbe, carbaryl, carbofuran, chlorperiphos, cypermethrine, diazinon, deltamethrin, dimethoate, fenithrothion, malathion, 3,5,6 trichloropyridol, methomyl, parathion, parathion méthyl et paraxon methyl.) par la LC-MS/MS en utilisant Quechers. Cette méthode a pu donner des LOQs variant de 0,5 à 100 ppb. De plus une validation analytique de méthode de détection du diazinon par la GC-MS a été élaborée.

Le mésusage des pesticides, soit par les professionnels, les agriculteurs ou la population générale s'approfondit avec la vente informelle et non contrôlée de ces molécules. Cette situation augmente les cas d'intoxications volontaires et accidentelles auprès de différentes tranches de la société. Deux études rétrospectives exploratoires ont été réalisées pour évaluer l'exposition aux pesticides chez des professionnels (agents d'hygiène et agriculteurs) et chez la population marocaine. Ceci par questionnaire et par le biomonitoring en utilisant la mesure de l'activité cholinestérasique et l'analyse chromatographique par GC-MS et LC-MS/MS. Il s'agit de 453 analyses réalisées. Une détection de 19 pesticides par GC-MS et LC-MS/MS. Pour les intoxications aiguës, 50 % des cas sont des enfants âgées de 1 jour à 14 ans. Alors que chez les agents d'hygiène, 28% sont analphabètes et 62% utilisent au moins un seul moyen de protection contre les pesticides lors de la manipulation. Ils affirment que la durée de contact avec ces molécules varient entre 1 an et 36 ans. Pour les agriculteurs, 14% des participants ont été déjà hospitalisés à cause d'une intoxication par les pesticides.

Ce travail contribue à mettre une alerte toxicologique dans le contexte des intoxications aiguës et chroniques aux pesticides. Une réglementation stricte doit se dresser sur ce point. Les campagnes de sensibilisation doivent se renforcer dans les régions agricoles et auprès des professions liées à l'utilisation des pesticides. Pour autant, le port des moyens de protection doit être obligé pour les travailleurs en contact régulier avec les pesticides.

L'apport des analyses toxicologiques est d'autant bien éclairé pour les cas d'intoxications aiguës par les pesticides, surtout pour les cas où le diagnostic est difficile.

Pour l'exposition professionnelle, un nombre de participants doit être représentatif pour des conclusions fiables. Aussi, des prélèvements avant et après l'exposition doivent être considérés, ou même un prélèvement urinaire de 24 heures. Même, la recherche analytique par chromatographie doit se focaliser sur la recherche des métabolites surtout dans le cas de la recherche dans les urines. Des études basées sur ces critères doivent être envisagées pour le développement de méthodes analytiques pour renforcer les investigations sur la surveillance biologique chez les populations cibles. Encore, il est fortement recommandé de piloter des études de développement analytique des méthodes de détection et de dosage des pesticides et leurs métabolites dans les matrices biologiques humaines. C'est un domaine qui suscite l'intérêt des analystes toxicologues dans le monde entier.

Références

- [1] A. Hormatallah, « Assistance technique sur la réglementation et gestion des pesticides au maroc », IAV Hassan II, Rabat, 2011.
- [2] N. Rhalem, A. Khattabi, S. Achour, A. Soulaymani, et R. Soulaymani Bencheikh, « Facteurs prédictifs de gravité de l'intoxication aux pesticides. Expérience du Centre Antipoison du Maroc », *Ann. Toxicol. Anal.*, vol. 21, n° 2, p. 79-84, 2009, doi: 10.1051/ata/2009039.
- [3] M. Eddleston et M. R. Phillips, « Self poisoning with pesticides », *BMJ*, vol. 328, n° 7430, p. 42-44, janv. 2004, doi: 10.1136/bmj.328.7430.42.
- [4] M. Windy, R. Soulaymani-bencheikh, N. Rhalem, R. Hmimou, et G. Jalal, « Intoxication aiguë par les pesticides au Maroc données du centre antipoison et de pharmacovigilance du Maroc (2008-2016), page 6- Toxicologie Maroc- N° 39 - 4ème trimestre 2018. », 2018.
- [5] S. M. Snedeker, « Pesticides and breast cancer risk: a review of DDT, DDE, and dieldrin. », *Environ. Health Perspect.*, vol. 109, n° Suppl 1, p. 35-47, mars 2001.
- [6] N. M. Niehoff, H. B. Nichols, A. J. White, C. G. Parks, A. A. D'Aloisio, et D. P. Sandler, « Childhood and Adolescent Pesticide Exposure and Breast Cancer Risk », *Epidemiol. Camb. Mass*, vol. 27, n° 3, p. 326-333, mai 2016, doi: 10.1097/EDE.0000000000000451.
- [7] A. Blanc-Lapierre *et al.*, « Chronic central nervous system effects of pesticides: state-of-the-art », *Rev. Epidemiol. Sante Publique*, vol. 60, n° 5, p. 389-400, oct. 2012, doi: 10.1016/j.respe.2012.03.006.
- [8] L. G. Costa, G. Giordano, M. Guizzetti, et A. Vitalone, « Neurotoxicity of pesticides: a brief review », *Front. Biosci. J. Virtual Libr.*, vol. 13, p. 1240-1249, janv. 2008, doi: 10.2741/2758.
- [9] R. Béranger, « L'impact de l'environnement sur la grossesse et le développement : données de la littérature », *Rev. Sage-Femme*, vol. 16, n° 4, p. 238, 2017, doi: 10.1016/j.sagf.2017.06.004.
- [10] A. Mamadou, A. Doumma, A. Mazih, et B. M. Coulibaly, « Exposition aux organophosphorés en milieu rural nigérien : étude de l'activité enzymatique érythrocytaire des cholinestérases comme indicateur biologique », *Vertigo - Rev. Électronique En Sci. Environ.*, n° Volume 8 Numéro 3, janv. 2009, doi: 10.4000/vertigo.6432.
- [11] R. Mejía *et al.*, « Pesticide-Handling Practices in Agriculture in El Salvador: An Example from 42 Patient Farmers with Chronic Kidney Disease in the Bajo Lempa Region », 2014.
- [12] K. M. Hayden *et al.*, « Occupational exposure to pesticides increases the risk of incident AD: the Cache County study », *Neurology*, vol. 74, n° 19, p. 1524-1530, mai 2010, doi: 10.1212/WNL.0b013e3181dd4423.

- [13] M. BOUCHARD, « Biological Monitoring of Exposure to Organophosphorus Insecticides in a Group of Horticultural Greenhouse Workers | *Annals of Work Exposures and Health* | Oxford Academic ».
- [14] « Pesticide Use Pattern among Farmers in a Rural District of Meknes: Morocco ». <https://www.scirp.org/journal/paperinformation.aspx?paperid=72593> (consulté le juill. 02, 2021).
- [15] « Intérêt du dosage des cholinestérases dans le cadre des intoxications aux organophosphorés - EM consulte ». <https://www.em-consulte.com/article/856344/interet-du-dosage-des-cholinesterases-dans-le-cadr> (consulté le juill. 06, 2021).
- [16] M. G. Lionetto, R. Caricato, A. Calisi, M. E. Giordano, et T. Schettino, « Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives », *BioMed Res. Int.*, vol. 2013, p. 321213, 2013, doi: 10.1155/2013/321213.
- [17] F. He, « Biological monitoring of occupational pesticides exposure », *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, vol. 65, n° 1 Suppl, p. S69-76, 1993, doi: 10.1007/BF00381310.
- [18] M. Lotti, « Cholinesterase inhibition: complexities in interpretation », *Clin. Chem.*, vol. 41, n° 12 Pt 2, p. 1814-1818, déc. 1995.
- [19] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, et R. M. Feather-Stone, « A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity », *Biochem. Pharmacol.*, vol. 7, p. 88-95, juill. 1961, doi: 10.1016/0006-2952(61)90145-9.
- [20] L. Kapka-Skrzypczak, K. Sawicki, M. Czajka, W. A. Turski, et M. Kruszewski, « Cholinesterase activity in blood and pesticide presence in sweat as biomarkers of children's environmental exposure to crop protection chemicals », *Ann. Agric. Environ. Med.*, vol. 22, n° 3, p. 478-482, sept. 2015, doi: 10.5604/12321966.1167718.
- [21] J. Strelitz, L. S. Engel, et M. C. Keifer, « Blood acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as biomarkers of cholinesterase depression among pesticide handlers », *Occup. Environ. Med.*, vol. 71, n° 12, p. 842-847, déc. 2014, doi: 10.1136/oemed-2014-102315.
- [22] S. Jintana, K. Sming, Y. Krongtong, et S. Thanyachai, « Cholinesterase activity, pesticide exposure and health impact in a population exposed to organophosphates », *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, vol. 82, n° 7, p. 833-842, juill. 2009, doi: 10.1007/s00420-009-0422-9.
- [23] H. A. Vikkey *et al.*, « Risk Factors of Pesticide Poisoning and Pesticide Users' Cholinesterase Levels in Cotton Production Areas: Glazoué and Savè Townships, in Central Republic of Benin », *Environ. Health Insights*, vol. 11, p. 1178630217704659, 2017, doi: 10.1177/1178630217704659.
- [24] E. Lacassie, P. Marquet, J.-M. Gaulier, M.-F. Drefyuss, et G. Lachatre, « Exploration analytique des intoxications par les pesticides | *Annales de Toxicologie Analytique* ».

- [25] S. E. Kettani, E. M. Azzouzi, O. Fennich, et A. E. Haimouti, « Exposition aux insecticides en milieu rural marocain : étude de l'activité enzymatique sérique des cholinestérases comme biomarqueur », *Cah. Détudes Rech. Francoph. Santé*, vol. 16, n° 3, p. 161-165, juill. 2006, doi: 10.1684/san.2006.0024.
- [26] R. Alami *et al.*, « Screening of pesticide residues in blood by GC-MS in patients admitted to the department of endocrinology ibn sina chu rabat », p. 8, 2016.
- [27] « Evaluation of chronic intoxication by organophosphate insecticides among hygiene workers in the city of Fez, Morocco - EM consulte ». <https://www.em-consulte.com/article/1048210/evaluation-of-chronic-intoxication-by-organophosph> (consulté le juill. 07, 2021).
- [28] F. Djellouli, « Aspect qualitatif et quantitatif des lipoprotéines sériques chez les agriculteurs utilisant les pesticides dans la région de Tlemcen - PDF Free Download », UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID-TLEMEN FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE, Algérie, 2013.
- [29] « Pesticides - CAPM Plateforme ». <http://www.capm-sante.ma/tv-pesticide>
- [30] F. Testud, *Pathologie toxique en milieu de travail 2e édition revue et augmentée - Edition ESKA*.
- [31] N. R. Council, C. on L. Sciences, B. on R. E. Research, et C. on H. R. of E. to R. (BEIR VI), *Health Effects of Exposure to Radon: BEIR VI*. National Academies Press, 1999.
- [32] S. Dulaurent, « Mise en place d'outils d'aide au traitement des demandes de dosage de pesticides dans les milieux biologiques », These de doctorat, Limoges, 2010. Consulté le: juill. 08, 2021. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.theses.fr/2010LIMO330B>
- [33] « ATSDR - Hazardous Substances Emergency Events Surveillance (HSEES) 2002 Annual Report ». <https://www.atsdr.cdc.gov/hs/hsees/annual2002.html>
- [34] D. Lambelet et L. Juc, « Migration de pesticides organochlorés dans les sols », <http://irevues.inist.fr/dechets-sciences-techniques/>. <http://odel.irevues.inist.fr/dechets-sciences-techniques/index.php?id=1182> (consulté le juill. 08, 2021).
- [35] D. Lambelet et L. Juc, « Accumulation de produits organiques persistants dans les chaînes trophiques », *Déchets Sci. Tech.*, vol. 56, p. 8-14, 2009, doi: 10.4267/dechets-sciences-techniques.256.
- [36] J. B. Braquenier, « Etude de la toxicité développementale d'insecticides organophosphorés: Analyse comportementale de la souris CD1. », 2009.
- [37] F. MAHIR, « Optimisation de détection des Organophosphorés dans les matrices biologiques par SPE et GC-MS », FST SETTAT, 2013.
- [38] T. R. Fukuto, « Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. Environmental health perspectives, 87, 245-254. », 1990.

- [39] J. R. von Osten, R. Tinoco-Ojanguren, A. M. Soares, et L. Guilhermino, « Effect of Pesticide Exposure on Acetylcholinesterase Activity in Subsistence Farmers from Campeche, Mexico: Archives of Environmental Health: An International Journal: Vol 59, No 8 », 2004.
- [40] R. Le Grand, S. Dulaurent, J. M. Gaulier, F. Saint-Marcoux, C. Moesch, et G. Lachâtre, « Simultaneous determination of five synthetic pyrethroid metabolites in urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Application to 39 persons without known exposure to pyrethroids », *Toxicol. Lett.*, vol. 210, n° 2, p. 248-253, avr. 2012, doi: 10.1016/j.toxlet.2011.08.016.
- [41] P. Leveau, « Intoxications aiguës par des produits phytosanitaires chez l'enfant », *J. Eur. Urgences Réanimation*, vol. 28, n° 4, p. 193-199, nov. 2016, doi: 10.1016/j.jeurea.2016.09.002.
- [42] « FAOSTAT ». <http://www.fao.org/faostat/fr/>
- [43] L. Juc, « `` ETUDE DES RISQUES LIES A L'UTILISATION DES PESTICIDES ORGANOCHLORES ET IMPACT SUR L'ENVIRONNEMENT ET LA SANTE HUMAINE ' ' », p. 228.
- [44] B. Bouchaib, F. Mohamed, I. Larbi, et L. Pierre, « Résidus de pesticides organochlorés chez les bivalves et les poissons de la lagune de Moulay Bouselham (Maroc) », *Afr. Sci. Rev. Int. Sci. Technol.*, vol. 3, n° 1, oct. 2010, doi: 10.4314/afsci.v3i1.61245.
- [45] R. Ben Aakame, « Caractérisation hydro-chimique, toxicologique et évaluation des risques sanitaires des eaux souterraines de la région de Sidi-Kacem (Maroc). », Université mohammed V Rabat, 2015.
- [46] H. Lakhalki *et al.*, « Assessment of contamination by organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyl's from Oualidia lagoon water (Morocco) », *Arab. J. Geosci.*, vol. 13, n° 16, p. 821, août 2020, doi: 10.1007/s12517-020-05761-5.
- [47] B. Benbakhta, M. Khallaf, M. Fekhaoui, A. E. Abidi, J. Dussauze, et A. Yahyaoui, « Organochlorine pesticides in sediments from the atlantic coast of Morocco. International journal of innovation and applied studies, 6(4), 1129. » 2014.
- [48] H. Fekkoul, « Groundwater contamination by nitrates, salinity and pesticides: case of the unconfined aquifer of triffa plain (Eastern Morocco). *Rev. Mar. Sci. Agron. Vét*, 2, 12-36. », 2013.
- [49] S. Quadroni et R. Bettinetti, « An unnoticed issue: Organochlorine pesticides in tobacco products around the world », *Chemosphere*, vol. 219, p. 54-57, mars 2019, doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.12.009.
- [50] R. Salghi *et al.*, « Pesticide residues in tomatoes from greenhouses in Souss Massa Valley, Morocco », *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 88, n° 3, p. 358-361, mars 2012, doi: 10.1007/s00128-011-0503-9.

- [51] T. Herrak, « Les pesticides de sante et d'hygiène publique, , direction de l'épidémiologie et de lutte contre les maladies », *Revue toxicologie Maroc*, 2018.
- [52] « WHO_TRS_973_fre.pdf ». Consulté le: juill. 08, 2021. [En ligne]. Disponible sur: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/78615/WHO_TRS_973_fre.pdf;jsessionid=B20BC00145D5F173C344B28162CA87F0?sequence=1
- [53] « annex_2_fr.pdf ». Consulté le: juill. 08, 2021. [En ligne]. Disponible sur: https://www.who.int/whr/2004/annex/topic/en/annex_2_fr.pdf
- [54] « Pesticides in the Modern World - Trends in Pesticides Analysis | IntechOpen ». <https://www.intechopen.com/books/pesticides-in-the-modern-world-trends-in-pesticides-analysis>
- [55] E. Masson, « Intoxications par les pesticides organophosphorés : nouveaux concepts », *EM-Consulte*. <https://www.em-consulte.com/article/228489/intoxications-par-les-pesticides-organophosphores-> (consulté le juill. 08, 2021).
- [56] « Prevention of suicide with regulations aimed at restricting access to highly hazardous pesticides: a systematic review of the international evidence - The Lancet Global Health ». [https://www.thelancet.com/journals/langlo/article/PIIS2214-109X\(17\)30299-1/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/langlo/article/PIIS2214-109X(17)30299-1/fulltext) (consulté le juill. 08, 2021).
- [57] F. Konradsen, « Acute pesticide poisoning--a global public health problem », *Dan. Med. Bull.*, vol. 54, n° 1, p. 58-59, févr. 2007.
- [58] E. Masson, « Intoxications aiguës par neurotoxiques organophosphorés : insecticides et armes chimiques », *EM-Consulte*. <https://www.em-consulte.com/article/7142/intoxications-aiguës-par-neurotoxiques-organophosp> (consulté le juill. 08, 2021).
- [59] S.-S. Chang *et al.*, « Factors associated with the decline in suicide by pesticide poisoning in Taiwan: A time trend analysis, 1987–2010 », *Clin. Toxicol.*, vol. 50, n° 6, p. 471-480, juill. 2012, doi: 10.3109/15563650.2012.688835.
- [60] T. Bonvoisin, L. Utyasheva, D. Knipe, D. Gunnell, et M. Eddleston, « Suicide by pesticide poisoning in India: a review of pesticide regulations and their impact on suicide trends », *BMC Public Health*, vol. 20, n° 1, p. 251, févr. 2020, doi: 10.1186/s12889-020-8339-z.
- [61] S.-S. Chang, T.-H. Lu, J. A. Sterne, M. Eddleston, J.-J. Lin, et D. Gunnell, « The impact of pesticide suicide on the geographic distribution of suicide in Taiwan: a spatial analysis », *BMC Public Health*, vol. 12, n° 1, p. 260, avr. 2012, doi: 10.1186/1471-2458-12-260.
- [62] E. J. Mew *et al.*, « The global burden of fatal self-poisoning with pesticides 2006-15: Systematic review », *J. Affect. Disord.*, vol. 219, p. 93-104, sept. 2017, doi: 10.1016/j.jad.2017.05.002.

- [63] M. Eddleston *et al.*, « Pesticide poisoning in the developing world--a minimum pesticides list », *Lancet Lond. Engl.*, vol. 360, n° 9340, p. 1163-1167, oct. 2002, doi: 10.1016/s0140-6736(02)11204-9.
- [64] H. Teixeira, P. Proença, M. Alvarenga, M. Oliveira, E. P. Marques, et D. N. Vieira, « Pesticide intoxications in the Centre of Portugal: three years analysis », *Forensic Sci. Int.*, vol. 143, n° 2-3, p. 199-204, juill. 2004, doi: 10.1016/j.forsciint.2004.02.037.
- [65] « Acute pesticide poisoning related deaths in Tehran during the period 2003-2004. - Abstract - Europe PMC ». <https://europepmc.org/article/med/17631456> (consulté le juill. 09, 2021).
- [66] S. Chowdhary, R. Bhattacharyya, et D. Banerjee, « Acute organophosphorus poisoning », *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.*, vol. 431, p. 66-76, avr. 2014, doi: 10.1016/j.cca.2014.01.024.
- [67] Y. Cho et J. W. Kim, « A Case of Amitraz Poisoning Initially Misdiagnosed as Acute Organophosphate Insecticide Poisoning », *Soonchunhyang Med. Sci.*, vol. 18, n° 2, p. 151-154, déc. 2012, doi: 10.15746/sms.12.033.
- [68] D. Boucaud-Maitre *et al.*, « Human exposure to banned pesticides reported to the French Poison Control Centers: 2012-2016 », *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 69, p. 51-56, juill. 2019, doi: 10.1016/j.etap.2019.03.017.
- [69] « Améliorer la disponibilité des services des centres antipoison en Afrique de l'Est : principaux points d'une étude de faisabilité concernant la création d'un centre antipoison sous-régional en Afrique de l'Est (Feasibility Study for a Subregional Poison Centre in the Eastern Africa Subregion), incluant un guide pour la mise en place d'un service d'information toxicologique ». <https://apps.who.int/iris/handle/10665/197517> (consulté le juill. 09, 2021).
- [70] F.-Z. H. Aoul *et al.*, « Problématique de l'intoxication par un rodenticide non autorisé à la commercialisation en Algérie : identification de sa matière active », *Ann. Toxicol. Anal.*, vol. 23, n° 2, Art. n° 2, 2011, doi: 10.1051/ata/2011115.
- [71] N. Mahdeb, S. Mariem, et B. Abdelouahab, « ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE DES CAS D'INTOXICATIONS AIGUËS TRAITES A L'HOPITAL DE SETIF ENTRE JANVIER 2008 ET AVRIL 2012 (EST- ALGERIE) », *Eur. Sci. J. ESJ*, vol. 9, n° 3, Art. n° 3, janv. 2013, doi: 10.19044/esj.2013.v9n3p%p.
- [72] S. Mlayeh, K. Annabi, A. B. Daly, M. Jedidi, et M. B. Dhiab, « Pesticide poisoning deaths: a 19-year retrospective study of medicolegal autopsies in center Tunisia », *Egypt. J. Forensic Sci.*, vol. 10, n° 1, p. 26, août 2020, doi: 10.1186/s41935-020-00201-7.
- [73] F. Khalsi, I. Trablesi, I. Belhadj, N. Brahmi, S. Hamouda, et K. Boussetta, « Acute Pesticide Poisoning in Children: A Review of 50 Cases », *Iran. J. Toxicol.*, vol. 12, n° 6, p. 27-31, oct. 2018, doi: 10.32598/IJT.12.6.553.1.

- [74] N. Chaouali *et al.*, « [Acute poisoning with anticholinesterase carbamate pesticides: methomyl-lannate®] », *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, vol. 72, n° 6, p. 723-729, déc. 2014, doi: 10.1684/abc.2014.0999.
- [75] « Les intoxications aiguës en réanimation pédiatrique: Étude rétrospective à l'unité de réanimation pédiatrique au CHU Farhat Hached de Sousse, Tunisie - EM consulte ». <https://www.em-consulte.com/article/1407658/article/les-intoxications-aiguës-en-reanimation-pediatriqu> (consulté le juill. 09, 2021).
- [76] « Intoxications aiguës aux organophosphores chez la femme enceinte ». <https://www.panafrican-med-journal.com/content/article/25/227/full/> (consulté le juill. 09, 2021).
- [77] « The changing trends of childhood poisoning at a tertiary children's hospital in South Africa | Balme | South African Medical Journal ». <http://www.samj.org.za/index.php/samj/article/view/5149/3917> (consulté le juill. 09, 2021).
- [78] P. R. S. Bencheikh, « La révision de la réglementation des pesticides est nécessaire et urgente », p. 16.
- [79] H. Hami, A. Soulaymani, M. Windy, A. Mokhtari, et R. Soulaymani, « Young men and Suicide in Morocco », *J. Men's Health*, vol. 7, n° 3, p. 327-327.
- [80] A. Derkaoui *et al.*, « Intoxication aiguë sévère par les pesticides organophosphorés: à propos de 28 cas », *Pan Afr. Med. J.*, vol. 8, n° 16, Art. n° 16, mars 2011, doi: 10.11604/pamj.2011.8.16.543.
- [81] E. Masson, « The poisoning by the chloralose: Experience of the university hospital Hassan II of Fez between 2011 and 2014 », *EM-Consulte*. <https://www.em-consulte.com/article/1211937/the-poisoning-by-the-chloralose-experience-of-the-> (consulté le juill. 09, 2021).
- [82] M. Ait El Cadi, A. Mezzane, B. Meddah, Y. Khabbal, et L. Idrissi, « Fatal pesticides poisoning in Morocco (2000–2005) », *Ann. Toxicol. Anal.*, vol. 20, n° 2, p. 73-77, 2008, doi: 10.1051/ata/2009003.
- [83] B. Charra, A. Hachimi, A. Benslama, et S. Motaouakkil, « Intoxications aiguës graves chez l'adulte en réanimation médicale », *Ann. Toxicol. Anal.*, vol. 25, n° 1, Art. n° 1, 2013, doi: 10.1051/ata/2013030.
- [84] « L'intoxication par les pesticides chez l'enfant au Maroc : profil épidémiologique et aspects pronostiques (1990-2008) | Cairn.info ». <https://www.cairn.info/revue-sante-publique-2011-3-page-195.htm> (consulté le juill. 09, 2021).
- [85] C. Paget, S. Menard, I. Wroblewski, J. P. Gout, V. Danel, et M. Bost, « Intoxication aiguë par organophosphorés à la suite de l'utilisation d'un insecticide comme shampooing anti-poux », *Arch. Pédiatrie*, vol. 9, n° 9, p. 913-916, sept. 2002, doi: 10.1016/S0929-693X(02)00022-2.

- [86] G. M. Emerson, N. M. Gray, G. A. Jelinek, D. Mountain, et H. J. Mead, « Organophosphate poisoning in Perth, Western Australia, 1987-1996 », *J. Emerg. Med.*, vol. 17, n° 2, p. 273-277, avr. 1999, doi: 10.1016/s0736-4679(98)00191-7.
- [87] R. J. Zwiener et C. M. Ginsburg, « Organophosphate and carbamate poisoning in infants and children », *Pediatrics*, vol. 81, n° 1, p. 121-126, janv. 1988.
- [88] M. Lifshitz, E. Shahak, et S. Sofer, « Carbamate and organophosphate poisoning in young children », *Pediatr. Emerg. Care*, vol. 15, n° 2, p. 102-103, avr. 1999, doi: 10.1097/00006565-199904000-00006.
- [89] M. L. Mortensen, « Management of acute childhood poisonings caused by selected insecticides and herbicides », *Pediatr. Clin. North Am.*, vol. 33, n° 2, p. 421-445, avr. 1986, doi: 10.1016/s0031-3955(16)35012-x.
- [90] E. Masson, « P179 - Les intoxications infantiles dans la région de Fès-Boulemane, Maroc », *EM-Consulte*. <https://www.em-consulte.com/article/260195> (consulté le juill. 09, 2021).
- [91] E. Masson, « Profil épidémiologique des intoxications par les pesticides chez les enfants au Maroc », *EM-Consulte*. <https://www.em-consulte.com/article/1289875/profil-epidemiologique-des-intoxications-par-les-p> (consulté le juill. 09, 2021).
- [92] K. Kg, A. Yt, et D. Kf, « 7- SILUE DA, KOUAKOU B, NANHO DC, DJOMAN AI, MEITE N, AYEMOU R, KAMARA I, NDAHTZ E, TOLO », p. 65, 2015.
- [93] « Memoire Online - Etude sur les pesticides - Awatef Berrah ». https://www.memoireonline.com/11/12/6459/m_Etude-sur-les-pesticides.html (consulté le juill. 09, 2021).
- [94] L. Aubeneau, P. A. Bohu, D. Hannequin, et D. Maltête, « Syndrome parkinsonien chronique chez un homme exposé pendant dix ans à des pulvérisations d'insecticides », *Rev. Neurol. (Paris)*, vol. 164, n° 4, p. 374-376, avr. 2008, doi: 10.1016/j.neurol.2007.08.011.
- [95] A. Aitio, « Guidance values for the biomonitoring of occupational exposure. State of the art », *Med. Lav.*, vol. 97, n° 2, p. 324-331, avr. 2006.
- [96] D. B. Barr et L. L. Needham, « Analytical methods for biological monitoring of exposure to pesticides: a review », *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, vol. 778, n° 1-2, p. 5-29, oct. 2002, doi: 10.1016/s1570-0232(02)00035-1.
- [97] T. Shafik, D. E. Bradway, H. F. Enos, et A. R. Yobs, « Human exposure to organophosphorus pesticides. Modified procedure for the gas-liquid chromatographic analysis of alkyl phosphate metabolites in urine », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 21, n° 4, p. 625-629, juill. 1973, doi: 10.1021/jf60188a036.

- [98] A. Duggan *et al.*, « Di-alkyl phosphate biomonitoring data: assessing cumulative exposure to organophosphate pesticides », *Regul. Toxicol. Pharmacol. RTP*, vol. 37, n° 3, p. 382-395, juin 2003, doi: 10.1016/s0273-2300(03)00031-x.
- [99] N. D. Forsberg *et al.*, « Organophosphorus pesticide degradation product in vitro metabolic stability and time-course uptake and elimination in rats following oral and intravenous dosing », *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.*, vol. 41, n° 5, p. 422-429, mai 2011, doi: 10.3109/00498254.2010.550656.
- [100] L. Chen *et al.*, « Absorption and excretion of organophosphorous insecticide biomarkers of malathion in the rat: Implications for overestimation bias and exposure misclassification from environmental biomonitoring », *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 65, n° 3, p. 287-293, avr. 2013, doi: 10.1016/j.yrtph.2012.12.010.
- [101] M. Zlatković, N. Krstić, V. Subota, B. Bošković, et S. Vučinić, « Određivanje referentnih vrednosti aktivnosti acetil i butiril holinesteraze kod zdrave populacije u Srbiji », *Vojnosanit. Pregl.*, vol. 74, n° 8, Art. n° 8, sept. 2017, doi: 10.2298/VSP160303101Z.
- [102] A. Brock et V. Brock, « Factors affecting inter-individual variation in human plasma cholinesterase activity: body weight, height, sex, genetic polymorphism and age », *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 24, n° 1, p. 93-99, janv. 1993, doi: 10.1007/BF01061095.
- [103] L. H. Sánchez, O. M. Medina, G. Gómez, C. I. González, et Ó. Flórez-Vargas, « Laboratory genetic-based reference values for cholinesterase activity in a Colombian population: A step forward in personalized diagnostics », *Biomed. Rev. Inst. Nac. Salud*, vol. 35 Spec, p. 20-29, août 2015, doi: 10.1590/S0120-41572015000500003.
- [104] A. Brock et V. Brock, « Plasma cholinesterase activity in a healthy population group with no occupational exposure to known cholinesterase inhibitors: relative influence of some factors related to normal inter- and intra-individual variations », *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, vol. 50, n° 4, p. 401-408, juin 1990, doi: 10.3109/00365519009091598.
- [105] M. F. Saeed *et al.*, « Pesticide exposure in the local community of Vehari District in Pakistan: An assessment of knowledge and residues in human blood », *Sci. Total Environ.*, vol. 587-588, p. 137-144, juin 2017, doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.02.086.
- [106] « Signes cliniques et variations de l'activité de la cholinestérase plasmatique chez des travailleurs exposés aux pesticides ». <http://www.camip.info/nous-avons-lu-pour-vous/toxicologie-et-hygiene/Signes-cliniques-et-variations-de> (consulté le juill. 09, 2021).
- [107] A. Naamane, A. Sadiq, A. Belhouari, N. Iounes, et S. E. Amrani, « Enquête sur l'utilisation des engrais et pesticides chez les agriculteurs de la région de Casablanca-Settat », *Rev. Marocaine Sci. Agron. Vét.*, vol. 8, n° 3, juin 2020, Consulté le: juill. 09, 2021. [En ligne]. Disponible sur: https://www.agrimaroc.org/index.php/Actes_IAPH2/article/view/836

- [108] S. Yucra, K. Steenland, A. Chung, F. Choque, et G. F. Gonzales, « Dialkyl phosphate metabolites of organophosphorus in applicators of agricultural pesticides in Majes – Arequipa (Peru) », *J. Occup. Med. Toxicol.*, vol. 1, n° 1, p. 27, déc. 2006, doi: 10.1186/1745-6673-1-27.
- [109] J. Hardt et J. Angerer, « Biological monitoring of workers after the application of insecticidal pyrethroids », *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, vol. 76, n° 7, p. 492-498, sept. 2003, doi: 10.1007/s00420-003-0451-8.
- [110] I. Berni *et al.*, « Understanding farmers' safety behavior regarding pesticide use in Morocco », *Sustain. Prod. Consum.*, vol. 25, p. 471-483, janv. 2021, doi: 10.1016/j.spc.2020.11.019.
- [111] « The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2019 », p. 98.
- [112] R. Sapbamrer et A. Thammachai, « Factors affecting use of personal protective equipment and pesticide safety practices: A systematic review », *Environ. Res.*, vol. 185, p. 109444, juin 2020, doi: 10.1016/j.envres.2020.109444.
- [113] « Chemical Identification and its Quality Assurance | Boris L. Milman | Springer ». <https://www.springer.com/gp/book/9783642153600> (consulté le juill. 09, 2021).
- [114] « [Recommendations for the prescription, implementation and interpretation of medical examinations in biology in the context of severe poisoning] - PubMed ». <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22796615/> (consulté le juill. 09, 2021).
- [115] F. Chapuis-Hugon et V. Pichon, « Utilisation d'outils sélectifs pour l'analyse de traces dans des échantillons complexes », 2010, doi: 10.1051/ATA/2010016.
- [116] « ACS Symposium Series (ACS Publications) ». <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-2007-0951.ch010> (consulté le juill. 09, 2021).
- [117] J.-P. Anger et P. Kintz, « Difficultés analytiques de la caractérisation des pesticides dans le sang », *Ann. Toxicol. Anal.*, vol. 21, n° 3, Art. n° 3, 2009, doi: 10.1051/ata/2009041.
- [118] D. A. Lambropoulou et T. A. Albanis, « Liquid-phase micro-extraction techniques in pesticide residue analysis », *J. Biochem. Biophys. Methods*, vol. 70, n° 2, p. 195-228, mars 2007, doi: 10.1016/j.jbbm.2006.10.004.
- [119] L. Humbert, « Extraction en phase solide (SPE) : théorie et applications », *Ann. Toxicol. Anal.*, vol. 22, n° 2, p. 61-68, 2010, doi: 10.1051/ata/2010010.
- [120] A. Turcant, A. Premel-cabic, A. Cailleux, et P. Allain, « Toxicological Screening of Drugs by Microbore High-Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detection and Ultraviolet Spectral Library Searches », *Clin Chem*, p. 1210-1215, 1991.
- [121] L. Humbert et C. Richeval, « Analyse toxicologique avec mesure par « masse exacte ». Caractérisation de métabolites urinaires par couplage UPLC/QTOF : apports et intérêts dans le

- cadre de la soumission chimique », *Ann. Toxicol. Anal.*, vol. 24, n° 2, p. 87-96, 2012, doi: 10.1051/ata/2012008.
- [122] *Analyse chimique*. 2021. Consulté le: juill. 09, 2021. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.dunod.com/sciences-techniques/analyse-chimique-methodes-et-techniques-instrumentales-1>
- [123] « FT-Spectrometrie_de_masse.pdf ». Consulté le: juill. 09, 2021. [En ligne]. Disponible sur: http://www.cscq.ch/SiteCSCQ/FichierPDF_FR/FT-Spectrometrie_de_masse.pdf
- [124] M. Debbab, « Contribution à l'étude de résidus d'une formulation de cyperméthrine (insecticide) dans certains légumes et leurs effets sur l'activité antioxydante de ces denrées », 2014, Consulté le: juill. 09, 2021. [En ligne]. Disponible sur: <http://thesesenafrique.imist.ma/handle/123456789/1464>
- [125] « extrait de l'ISO/CEI 17025, § 5.4.5.3 note 3, et NF EN ISO 15189 ».
- [126] « manuel-qualite-17025-edition-10.pdf ». Consulté le: juill. 09, 2021. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.inspq.qc.ca/sites/default/files/documents/ctq/manuel-qualite-17025-edition-10.pdf>
- [127] B. Dingeon *et al.*, « Aide à la validation des méthodes en Toxicologie et Suivi Thérapeutique Pharmacologique », *Ann. Toxicol. Anal.*, vol. 17, n° 3/supplément 1, p. 1-20, 2005, doi: 10.1051/ata/2005040.
- [128] « Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf ». Consulté le: juill. 11, 2021. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>
- [129] P. S. Fišerová, J. Kohoutek, C. Degrendele, M. A. Dalvie, et J. Klánová, « New sample preparation method to analyse 15 specific and non-specific pesticide metabolites in human urine using LC-MS/MS », *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, vol. 1166, p. 122542, mars 2021, doi: 10.1016/j.jchromb.2021.122542.
- [130] E. Park *et al.*, « Method for the simultaneous analysis of 300 pesticide residues in hair by LC-MS/MS and GC-MS/MS, and its application to biomonitoring of agricultural workers », *Chemosphere*, vol. 277, p. 130215, août 2021, doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.130215.
- [131] A. M. Rebelo *et al.*, « Determination of twenty pesticides in rice by employing QuEChERS and LC-ESI-MS/MS », *Anal. Methods*, vol. 6, n° 23, p. 9469-9476, nov. 2014, doi: 10.1039/C4AY01966K.
- [132] O. P. Luzardo *et al.*, « Validated analytical methodology for the simultaneous determination of a wide range of pesticides in human blood using GC-MS/MS and LC-ESI/MS/MS and its application in two poisoning cases », *Sci. Justice J. Forensic Sci. Soc.*, vol. 55, n° 5, p. 307-315, sept. 2015, doi: 10.1016/j.scijus.2015.04.007.

- [133] M. Á. González-Curbelo, B. Socas-Rodríguez, A. V. Herrera-Herrera, J. González-Sálamo, J. Hernández-Borges, et M. Á. Rodríguez-Delgado, « Evolution and applications of the QuEChERS method », *Trends Anal. Chem.*, 2015, Consulté le: juill. 11, 2021. [En ligne]. Disponible sur: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201800401629>
- [134] S. J. Garfitt, K. Jones, H. J. Mason, et J. Cocker, « Exposure to the organophosphate diazinon: data from a human volunteer study with oral and dermal doses », *Toxicol. Lett.*, vol. 134, n° 1-3, p. 105-113, août 2002, doi: 10.1016/s0378-4274(02)00178-9.
- [135] J. L. Martínez Vidal, P. Plaza-Bolaños, R. Romero-González, et A. Garrido Frenich, « Determination of pesticide transformation products: a review of extraction and detection methods », *J. Chromatogr. A*, vol. 1216, n° 40, p. 6767-6788, oct. 2009, doi: 10.1016/j.chroma.2009.08.013.
- [136] C. Lu, T. Rodríguez, A. Funez, R. S. Irish, et R. A. Fenske, « The Assessment of Occupational Exposure to Diazinon in Nicaraguan Plantation Workers Using Saliva Biomonitoring », *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1076, n° 1, p. 355-365, 2006, doi: 10.1196/annals.1371.057.
- [137] S. A. S. Ph.D, G. W. S. Ph.D, A. C. M.S, N. S. A. Ph.D, S. E.-F. D. P.H, et A.-K. E.-S. Ph.D, « Two Acute Human Poisoning Cases Resulting from Exposure to Diazinon Transformation Products in Egypt », *Arch. Environ. Health Int. J.*, vol. 37, n° 4, p. 207-212, juill. 1982, doi: 10.1080/00039896.1982.10667566.
- [138] J. Hardt et J. Angerer, « Determination of dialkyl phosphates in human urine using gas chromatography-mass spectrometry », *J. Anal. Toxicol.*, vol. 24, n° 8, p. 678-684, déc. 2000, doi: 10.1093/jat/24.8.678.
- [139] M. Ibáñez, J. V. Sancho, O. J. Pozo, et F. Hernández, « Use of liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry in the elucidation of transformation products and metabolites of pesticides. Diazinon as a case study », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 384, n° 2, p. 448-457, janv. 2006, doi: 10.1007/s00216-005-0167-6.
- [140] R. A. Yokley, N. Shen, et M. W. Cheung, « Determination of Two Oxy-Pyrimidine Metabolites of Diazinon in Urine by Gas Chromatography/Mass Selective Detection and Liquid Chromatography/Electrospray Ionization/Mass Spectrometry/Mass Spectrometry », *J. AOAC Int.*, vol. 83, n° 5, p. 1229-1238, sept. 2000, doi: 10.1093/jaoac/83.5.1229.
- [141] P. Salm, P. J. Taylor, D. Roberts, et J. de Silva, « Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantitative determination of the organophosphorus pesticides dimethoate, fenthion, diazinon and chlorpyrifos in human blood », *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, vol. 877, n° 5-6, p. 568-574, févr. 2009, doi: 10.1016/j.jchromb.2008.12.066.

- [142] J. Seifert et T. Pewnim, « Alteration of mice L-tryptophan metabolism by the organophosphorous acid triester diazinon », *Biochem. Pharmacol.*, vol. 44, n° 11, p. 2243-2250, déc. 1992, doi: 10.1016/0006-2952(92)90353-k.
- [143] F. Musshoff, H. Junker, et B. Madea, « Simple determination of 22 organophosphorous pesticides in human blood using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometric detection », *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 40, n° 1, p. 29-34, janv. 2002.
- [144] H. Tsoukali, G. Theodoridis, N. Raikos, et I. Grigoratou, « Solid phase microextraction gas chromatographic analysis of organophosphorus pesticides in biological samples », *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, vol. 822, n° 1-2, p. 194-200, août 2005, doi: 10.1016/j.jchromb.2005.05.035.
- [145] I. Papoutsis *et al.*, « Development and validation of a simple GC-MS method for the simultaneous determination of 11 anticholinesterase pesticides in blood--clinical and forensic toxicology applications », *J. Forensic Sci.*, vol. 57, n° 3, p. 806-812, mai 2012, doi: 10.1111/j.1556-4029.2011.02031.x.
- [146] N. I. P. Valente, S. Tarelho, A. L. Castro, A. Silvestre, et H. M. Teixeira, « Analysis of organophosphorus pesticides in whole blood by GC-MS- μ ECD with forensic purposes », *J. Forensic Leg. Med.*, vol. 33, p. 28-34, juill. 2015, doi: 10.1016/j.jflm.2015.03.006.
- [147] W. Naksen *et al.*, « A single method for detecting 11 organophosphate pesticides in human plasma and breastmilk using GC-FPD », *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, vol. 1025, p. 92-104, juill. 2016, doi: 10.1016/j.jchromb.2016.04.045.
- [148] J. J. Pérez *et al.*, « Measurement of pyrethroid, organophosphorus, and carbamate insecticides in human plasma using isotope dilution gas chromatography-high resolution mass spectrometry », *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, vol. 878, n° 27, p. 2554-2562, oct. 2010, doi: 10.1016/j.jchromb.2010.03.015.
- [149] E. Lacassie, M. F. Dreyfuss, J. M. Gaulier, P. Marquet, J. L. Daguet, et G. Lachâtre, « Multiresidue determination method for organophosphorus pesticides in serum and whole blood by gas chromatography-mass-selective detection », *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.*, vol. 759, n° 1, p. 109-116, août 2001, doi: 10.1016/s0378-4347(01)00211-0.
- [150] E. Lacassie, P. Marquet, et J.-M. Gaulier, « Sensitive and specific multiresidue methods for the determination of pesticides of various classes in clinical and forensic toxicology », *Forensic Sci. Int.*, p. 10, 2001.
- [151] E. Gallardo, M. Barroso, C. Margalho, A. Cruz, D. N. Vieira, et M. López-Rivadulla, « Determination of parathion in biological fluids by means of direct solid-phase

- microextraction », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 386, n° 6, p. 1717-1726, nov. 2006, doi: 10.1007/s00216-006-0735-4.
- [152] F. Guan *et al.*, « Headspace solid-phase microextraction and gas chromatographic determination of dinitroaniline herbicides in human blood, urine and environmental water », *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.*, vol. 714, n° 2, p. 205-213, sept. 1998, doi: 10.1016/S0378-4347(98)00234-5.
- [153] « Manual, I. Test-mate ChE Cholinesterase Test System (Model 400). »
- [154] F. Worek *et al.*, « On-site analysis of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity with the ChE check mobile test kit-Determination of reference values and their relevance for diagnosis of exposure to organophosphorus compounds », *Toxicol. Lett.*, vol. 249, p. 22-28, mai 2016, doi: 10.1016/j.toxlet.2016.03.007.
- [155] « TOXICOLOGICAL DRUG SCREENING BY GC-MS VERSUS HPLC-DAD USING A COMMON EFFICIENT EXTRACTION PROCEDURE/SCREENING TOXICOLOGIQUE DES MEDICAMENTS PAR HPLC-DAD ET GC-MS: PROTOCOLE D'EXTRACTION UNIQUE. Scientific Study & Research. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry, 16(1), 37. », 2015.
- [156] « Réflexions sur l'utilisation des pesticides en milieu urbain », *INSPQ*. <https://www.inspq.qc.ca/publications/63> (consulté le juill. 11, 2021).
- [157] A. Detsouli *et al.*, « Epidemiology of acute pesticide poisoning in Morocco: a 7-year retrospective study (2008-2014) », *J. Mater. Environ. Sci.*, vol. 8, n° 12, oct. 2017, doi: 10.26872/jmes.2017.8.12.445.
- [158] A. Derkaoui *et al.*, « [Severe acute poisoning by organophosphorus pesticides: report of 28 cases] », *Pan Afr. Med. J.*, vol. 8, p. 16, janv. 2011.
- [159] K. Soltaninejad, M. Faryadi, et F. Sardari, « Acute pesticide poisoning related deaths in Tehran during the period 2003-2004 », *J. Forensic Leg. Med.*, vol. 14, n° 6, p. 352-354, août 2007, doi: 10.1016/j.jflm.2006.12.011.
- [160] « Traité de toxicologie médico-judiciaire - 2nd Edition ». <https://www.elsevier.com/books/traite-de-toxicologie-medico-judiciaire/9782294715617> (consulté le juill. 11, 2021).
- [161] S. Savin, B. Carligny, N. Azaroual, et M. LhermitteU, « 1H NMR Spectroscopy and GC-MS Analysis of (z-Chloralose. Application to Two Poisoning Cases », *J. Anal. Toxicol.*, vol. 27, p. 6, 2003.
- [162] G. Hoizey, A. Muckensturm, M. Chèze, et M. Deveaux, « Chloralose analysis in a criminal case », *Toxicol. Anal. Clin.*, vol. 31, n° 2, Supplement, p. S38-S39, mai 2019, doi: 10.1016/j.toxac.2019.03.050.

- [163] (M.) ZHIOUA *et al.*, « Intoxication aiguë par le chloralose : à propos de 752 observations. », *Intox. Aiguë Par Chloralose À Propos 752 Obs.*, 2008.
- [164] N. Oulachguer, « PLACE DU BUREAU COMMUNAL D'HYGIENE DANS LE SYSTEME SANITAIRE », *J. Maroc. Sci. Médicales*, vol. 17, n° 4, Art. n° 4, 2010, doi: 10.48401/IMIST.PRSM/jmsm-v17i4.699.
- [165] « Lutte antivectorielle | Bureau Communal d'Hygiène de la ville de Rabat ». <https://bmhderabat.wordpress.com/lutte-antivectorielle/> (consulté le juill. 11, 2021).
- [166] « Maroc en chiffres | Téléchargements | Site institutionnel du Haut-Commissariat au Plan du Royaume du Maroc ». https://www.hcp.ma/downloads/Maroc-en-chiffres_t13053.html (consulté le juill. 11, 2021).
- [167] E. King, « Occupational hygiene aspects of biological monitoring », *Ann. Occup. Hyg.*, vol. 34, n° 3, p. 315-322, juin 1990, doi: 10.1093/annhyg/34.3.315.
- [168] F. Shihana, F. Worek, G. A. Dassanayake, S. H. Rathgamage, J. Dhanarisi, et N. A. Buckley, « Evaluation of the accuracy of “ChE check mobile” in measurement of acetylcholinesterase in pesticide poisoning », *Clin. Toxicol. Phila. Pa*, vol. 57, n° 6, p. 411-414, juin 2019, doi: 10.1080/15563650.2018.1530778.
- [169] J. Z. Karasova *et al.*, « Activity of cholinesterases in a young and healthy middle-European population: Relevance for toxicology, pharmacology and clinical praxis », *Toxicol. Lett.*, vol. 277, p. 24-31, août 2017, doi: 10.1016/j.toxlet.2017.04.017.
- [170] « Normal range of human red blood cell acetylcholinesterase activity - PubMed ». <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19538013/> (consulté le juill. 11, 2021).
- [171] T. Eddaya, A. Boughdad, L. Becker, P. Chaimbault, et A. Zaïd, « Utilisation et risques des pesticides en protection sanitaire de la menthe verte dans le Centre-Sud du Maroc (Use and risks of pesticides in sanitary protection of spearmint in south-central Morocco) », p. 10, 2015.
- [172] M. Knedel et R. Böttger, « [A kinetic method for determination of the activity of pseudocholinesterase (acylcholine acyl-hydrolase 3.1.1.8.)] », *Klin. Wochenschr.*, vol. 45, n° 6, p. 325-327, mars 1967, doi: 10.1007/BF01747115.
- [173] « Pesticide exposures, cholinesterase depression, and symptoms among North Carolina migrant farmworkers. » <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1614838/> (consulté le juill. 11, 2021).
- [174] S. Noura, F. Abroug, S. Elatrous, R. Boujdaria, et S. Bouchoucha, « Prognostic value of serum cholinesterase in organophosphate poisoning », *Chest*, vol. 106, n° 6, p. 1811-1814, déc. 1994, doi: 10.1378/chest.106.6.1811.
- [175] International Program on Chemical Safety *et al.*, *WHO-UNEP sound management of pesticides and diagnosis and treatment of pesticide poisoning: a resource tool*. Geneva: Inter-organization Programme for the Sound Management of Chemicals, 2006.

- [176] K. Hayat, M. Ashfaq, U. Ashfaq, et M. A. Saleem, « Determination of pesticide residues in blood samples of villagers involved in pesticide application at District Vehari (Punjab), Pakistan », *Afr. J. Environ. Sci. Technol.*, vol. 4, n° 10, Art. n° 10, 2010, doi: 10.4314/ajest.v4i10.71330.
- [177] A. Ramesh et P. E. Ravi, « Electron ionization gas chromatography-mass spectrometric determination of residues of thirteen pyrethroid insecticides in whole blood », *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, vol. 802, n° 2, p. 371-376, avr. 2004, doi: 10.1016/j.jchromb.2003.12.016.
- [178] A. El Ouali Lalami, « Assessment of Contamination by The Organophosphorus of Human Matrix (Blood and Urine) at The Hygiene Agents in The City of Fez », *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.*, vol. 7, p. 2180-2188, sept. 2016.
- [179] F. Versace, F. Sporkert, P. Mangin, et C. Staub, « Rapid sample pre-treatment prior to GC-MS and GC-MS/MS urinary toxicological screening », *Talanta*, vol. 101, p. 299-306, nov. 2012, doi: 10.1016/j.talanta.2012.09.030.
-

Liste des publications et communications

Communications orales

- « Etude comparative de détection des organophosphorés dans le plasma et urine par GC-MS » Birich Bouchra, El Hajjaji Souad, Ghandi Mohamed, Ait Daoud Naima, Elmrabeh Seloua, Badrane Narjis, Soulaymani Bencheikh Rachida
4^{ème} Colloque international des produits phytosanitaires du 8 au 10 Octobre 2015 à FST Errachidia
- « Determination and quantification of diazinon in human plasma b gaz chromatographic method » Birich Bouchra, El Hajjaji Souad, Ghandi Mohamed, Ait Daoud Naima, Badrane Narjis, Soulaymani Bencheikh Rachida
6^{ème} congrès International de Toxicologie, du 15 au 17 Décembre 2016 à Marrakech.
- “Exposition des agents d’hygiène aux pesticides dans la ville de Rabat » Birich Bouchra, El Hajjaji Souad, Ghandi Mohamed, Ait Daoud Naima, Badrane Narjis, Soulaymani Bencheikh Rachida,
La journée Doctoriale de l’Institut Scientifique, Samedi 15 Décembre 2018 à Rabat.
- « Rôle des analyses toxicologiques dans la prise en charge des patients intoxiqués par l’aphachloralose » Birich Bouchra, El Hajjaji Souad, Ghandi Mohamed, Ait Daoud Naima, Badrane Narjis, Soulaymani Bencheikh Rachida
3^{ème} édition des Journées Pratiques Francophones des Sciences Analytiques (JPFSA), du 25 au 26 Avril 2019 à Marrakech
- « Biomonitoring of pesticide exposure among moroccan farmers » Birich Bouchra, El Hajjaji Souad, Ghandi Mohamed, Ait Daoud Naima, Badrane Narjis, Soulaymani Bencheikh Rachida
The 6th international symposium environment and sustainable development (ISESD) du 2 au 3 Octobre 2019 à Rabat.

Communications affichées

- « Dosage et screening toxicologique des pesticides dans le laboratoire toxicologique du centre antipoison et de pharmacovigilance du Maroc » Birich Bouchra, El Hajjaji Souad, Ghandi Mohamed, Ait Daoud Naima, Idrissi Mouncef, Soulaymani Bencheikh Rachida
3^{ème} édition des doctoriales du 6 au 8 Février 2014 à la FSR.
- « Optimisation de méthode de détection des 15 organochlorés dans le plasma par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse GC-MS » Birich

Bouchra, El Hajjaji Souad, Ghandi Mohamed, Ait Daoud Naima, Idrissi Mouncef, Soulaymani Bencheikh Rachida

3ème colloque international « Matériaux, Pollution et Environnement », le 19 Février 2014 à Tanger

- « Les paramètres de validation de méthode de détection des pesticides dans les matrices biologiques par chromatographie » Birich Bouchra, El Hajjaji Souad, Ghandi Mohamed, Ait Daoud Naima, Idrissi Mouncef, Soulaymani Bencheikh Rachida

La semaine de la science sous le thème : « L'innovation pour le Développement économique et social » du 28 au 02 Avril 2014 à la FSR

- « Détection des carbamates par gc-ms et hplc-dad dans le plasma : étude comparative » Birich B, El Hajjaji S, Ghandi M, Ait Daoud N, Elmrabeh S, Badrane N, Soulaymani Bencheikh R

4^{ème} édition des Doctoriales du 19 au 21 2015 à la FSR.

- « Optimisation de l'extraction des organophosphorés par extraction par phase solide SPE dans les matrices biologiques par GC-MS » Birich B, El Hajjaji S, Ghandi M, Ait Daoud N, Mahir F, Elmrabeh S, Khaya M, Idrissi M, Soulaymani Bencheikh R

1^{ière} rencontre internationale de chimie moléculaire chimiométrie et applications, du 28-29 Mai 2014 à la FST Béni mellal.

- « Optimisation de la méthode de détection des organochlorés dans les matrices biologiques par GC-MS » Birich B, El Hajjaji S, Ghandi M, Ait Daoud N, Elmrabeh S, Khaya M, Idrissi M, Badrane N, Soulaymani Bencheikh R

Le 5ème congrès international de toxicologie, du 23 au 26 Octobre 2014 à Agadir

- « Détection des organophosphorés dans le plasma et urine par GC-MS » Birich B, El Hajjaji S, Ghandi M, Ait Daoud N, Elmrabeh S, Khaya M, Idrissi M, Badrane N, Soulaymani Bencheikh R

Colloque international de toxicologie, du 22-23 Octobre 2015 à La faculté de médecine et de pharmacie de Fés.

- « Les paramètres de validation de méthode de détection des pesticides dans les matrices biologiques par chromatographie » Birich Bouchra, El Hajjaji Souad, Ghandi Mohamed, Ait Daoud Naima, Badrane Narjis, Soulaymani Bencheikh Rachida

5ème édition des Doctoriales 2016 FSR, du 9 au 11 Mars 2016

- « Analyses toxicologiques des pesticides dans les matrices biologiques » Birich Bouchra, El Hajjaji Souad, Ghandi Mohamed, Ait Daoud Naima, Badrane Narjis, Soulaymani Bencheikh Rachida
Journées Pratiques Francophones des Sciences Analytiques (JPFSA), du 27 au 28 avril 2017 à Marrakech.
- “Detection of 15 pesticides by LC-MS/MS chromatography” Birich Bouchra, El Hajjaji Souad, Ghandi Mohamed, Ait Daoud Naima, Badrane Narjis, Soulaymani Bencheikh Rachid
2ème édition des Journées Pratiques Francophones des Sciences Analytiques (JPFSA), Du 26 au 27 Avril 2018
- « Biological monitoring of exposure to insecticides for a groupe of Rabat City workers » Bouchra Birich, Souad El hajjaji, Fatima Zalagh, Naima Ait Daoud, Soulaymani Abdelmajid, Mohamed Ghandi, Rachida Soulaymani bencheikh, Narjis Badrane
7ème congrès International de Toxicologie Du 11 au 13 Octobre 2018 à Rabat.
- « Bio-monitoring de l’exposition aux pesticides chez des travailleurs des bureaux d’hygiène au Maroc » B. Birich, S. El hajjaji, M. Ghandi, N. Ait daoud, N. Badrane, R. Soulaymani bencheikh
International congress of analytical, forensic and clinical toxicology, 21-24 Mai 2019 Lille France

Publications internationales (acceptées)

1. **Birich B**, El Hajjaji S, Daoud NA, Bencheikh RS, Ghandi M, Badrane N. **A selective method for quantification of diazinon in human plasma by GC-MS.** Ann Biol Clin 2020; 78(6):617-622. doi:10.1684/abc.2020.1594
2. **Birich B**, El Hajjaji S, Ghandi M, Daoud NA, Badrane N, Bencheikh RS, **A simple method of detection of 15 organochlorine pesticides in human plasma using gas chromatography.** Chemical Data Collections 2020, <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2020.100562>
3. Yadini, A., El Fakir, L., **Birich, B.**, El Azzouzi, M., & El Hajjaji, S. **Optimisation of transformation kinetic of fenamiphos in aqueous media using experimental design.** Mater. Environ. Sci. 5 (S1) (2014) 2075-2080

Publications internationales (soumises)

4. Birich B, El Hajjaji S, Daoud NA, Bencheikh RS, Ghandi M, Badrane N. The role of toxicological analysis in the management of alpha-chloralose poisoning cases - about 4 cases – Annales de Toxicologie Analytique

5. Birich B, El Hajjaji S, Daoud NA, Bencheikh RS, Ghandi M, Badrane N. Bio-monitoring of exposure to pesticides among Moroccan workers

Annexes

Annexe 1 : Accord du comité d'éthique

Annexe 2

FORMULAIRE

COLLECTE DES DONNEES POUR L'EVALUATION DE L'EXPOSITION AUX PESTICIDES

N° fiche : Date : Nom investigateur :

CARACTERISTIQUES EPIDEMIOLOGIQUE

Données sociodémographiques

Initial ou code			Age			
Marié (e)		Oui	Non		Nombre d'enfant	
Niveau scolaire		Analphabète	Primair e		Secondaire	Unive rsitair e
Poids			Taille			
Origine géographique et ethnique						
Nationalité						
Adresse de résidence						
Description d'habitat						
Voisinage/Industrie		Non	Oui		Quelle type	

Antécédents

- Médicaux

Diabète		HTA		IR		
Infections chroniques (VIH, Hépatite)		Non		Oui		
Néoplasie		Non		Oui		
Grossesse		Non		Oui		

- Chirurgicaux :

- Traitements pris :

- Habitudes alcoolo-tabagiques et prise de drogues :

Tabac		Non		Oui	Nombre paquets par jours		depuis quand	
Alcool		Non		Oui	< 3 fois par semaine		> 3 fois par semaine	
Autres drogues		Non		Oui				

EXPOSITION

Habitudes alimentaires

L'aliment	Fréquence de consommation						
	1J/S	2J/S	3J/S	4J/S	5J/S	6J/S	7J/S
Légumes fraîches							
Fruits,							
Viandes rouge ou blanche,							
Poisson							
Thé							
Produits laitiers							
Charcuterie							
Conserves							
Pain							
Eau							

Achat : Grandes surfaces

Marchants ambulants (souk)

Potagé (fait maison)

Activités parallèles avec manipulation de pesticides à usage domestique

Non Oui

Données d'exposition au niveau du poste

- Description du poste :
.....
- Durée de contact :
- Rythme de contact : par jour par semaine par mois
- Nom commercial des pesticides et composition.....
- Nature : Liquide Poudre solide autres
- Présence de solvant ;

PRETECTION ET PREVENTION

Moyens de protection

Masque	Non	Oui
Gants	Non	Oui
Blouse	Non	Oui
Combinaison	Non	Oui
Autres	Non	Oui

Non pourquoi

Moyen de prévention de contamination

Lavage des mains après utilisation	Non	Oui
Douche après utilisation	Non	Oui
Changement des habits avant la manipulation	Non	Oui
Garder les mêmes vêtements en dehors du lieu de travail	Non	Oui
Boire, Fumer, Manger dans les lieux de manipulations	Non	Oui
Formation sur la protection et de prévention	Non	Oui

SIGNES CLINIQUES ET NEUROLOGIQUES

Signes cliniques

Irritations muqueuses	Non	Oui	
Irritations muqueuses			Oculaire Buccale Nasale

Irritation de la peau

Non

Oui

Signes neurologiques

Fourmillement	Non	Oui
Engourdissement	Non	Oui
Fatigue	Non	Oui
Céphalées	Non	Oui
Troubles de sommeil	Non	Oui
Trouble de l'équilibre	Non	Oui
Autres		

Perturbations biologiques (bilan fait)

Glycémie	Non	Oui
Bilan hépatique	Non	Oui
Bilan rénal	Non	Oui
Bilan thyroïdien	Non	Oui

Annexe 3 : Consentement écrit arabe

استمارة الموافقة النهائية

اسم الباحث..... الهاتف.....
العنوان.....
الاسم العائلي للمتطوع..... الاسم الشخصي.....
تاريخ.....
الازدياد..... العنوان.....

بتاريخ اقترح علي إمكانية المساهمة في هاته الدراسة، دون تحقيق فائدة شخصية مباشرة، حول
"تقييم حالة التعرض المتكرر للمبيدات الزراعية عند وكلاء النظافة بالمكتب البلدي للنظافة بجهة الرباط-سلا
والقنيطرة"

لقد تم ابلاغي بكل النقط الآتية:

الهدف من الدراسة-الطريقة-المدة – الاختبارات الضرورية التي على القيام بها.
من حقي رفض المشاركة في الدراسة رغم موافقتي من قبل، كما انه يمكن سحب مشاركتي في أي لحظة.
تم اعلامي بان المعطيات الخاصة بي ستبقى سرية ولا اسمح بالاطلاع عليها الا من طرف الأشخاص الذين ساهموا في
البحث.

اقبل بان تكون المعطيات المسجلة بمناسبة هذه الدراسة موضوع معالجة معلوماتية بالنسبة للباحث المشرف على الدراسة.
التزم بان لا أشارك في أي دراسة مشابهة متزامنة مع هاته الدراسة في الثلاث أشهر القادمة.
بعدها تمت الإجابة عن كل اسئلتني، اعطي موافقتي للمشاركة في هاته الدراسة.
نسخة من الاستمارة تعطى للوكيل.

في:..... بتاريخ.....

امضاء المشرف على الدراسة

Annexe 4 : consentement écrit Français

FORMULAIRE DE CONSENTEMENT ECLAIRE

Nom de l'investigateur : Tél :

Adresse :

Nom de l'agent: Prénom :

Date de naissance : / /

Adresse :

Lem'a proposé la possibilité de participer sans bénéfice individuel direct à une étude intitulée : **Evaluation De L'exposition Chroniques Aux Pesticides Chez Et Les Agents D'hygiène Du BCH De La Région Rabat-Sale-Témara-Skhirat- Khmissat et Kénitra.**

Les points suivants, détaillés dans le document d'information, ont été portés à ma connaissance :

- L'objectif, la méthode, la durée, les examens nécessaires
- Les contraintes et les possibles effets indésirables sur ma santé,
- Mon droit de refuser de participer et, même après avoir donné mon accord, la possibilité
- De retirer mon consentement de tout moment.

Un résumé écrit des informations communiquées m'a été remis.

Les données qui me concernent resteront strictement confidentielles et je n'autorise leur consultation que par les personnes qui participent à la recherche.

J'accepte que les données enregistrées à l'occasion de cette étude puissent faire l'objet d'un traitement informatisé, par l'investigateur.

Je m'engage, en outre, à ne pas participer à une autre recherche similaire dans un délai de 3 mois.

Fait à : Le : Signature de l'investigateur :

Annexe 5 : Fiche d'information Arabe

وثيقة المعلومات العامة

نسخة من الوثيقة تقدم للمشارك من طرف المشرف على الدراسة

عنوان الدراسة

تقييم حالة التعرض المتكرر للمبيدات عند وكلاء النظافة بالمكتب البلدي للنظافة بجهة الرباط سلا والقنيطرة"

سيدي، سيدي،

يشرفني أن أعرض عليكم أنا سعاد الحجاجي، أستاذة التعليم العالي بكلية العلوم بالرباط، المشاركة في دراسة يحتضنها المركز المغربي لمحاربة التسمم واليقظة الدوائية.

المرجو قبل موافقتكم على المشاركة في هاته الدراسة، الاطلاع على هاته الوثيقة التي تجدون فيها كل المعلومات التي تتعلق بجميع جوانب هاته الدراسة. لا تترددوا ابدا في طرح أي سؤال يحيركم للطبيب المركز. اريد ان اذكركم ان مشاركتكم اختيارية كليا، إذا لم تجدوا لديكم الرغبة في ان تكونوا جزءا من هاته الدراسة يمكنكم اخبار الطبيب او المشرف على الدراسة في أي وقت.

الإسم، عنوان وهاتف المركز المحتضن

المركز المغربي لمحاربة التسمم واليقظة الدوائية

شارع لمفضل الشرقاوي، مدينة العرفان، ص ب 6671 الرباط 10100 المغرب

الهاتف: 67 71 77 37 05 / 69 71 77 37 05

الإسم وهاتف المشرف على الدراسة

الأستاذة سعاد الحجاجي

الهاتف: 066103102

الهدف من الدراسة

الهدف العام

تقييم حالة التعرض المتكرر للمبيدات لدى وكلاء النظافة بالمكتب البلدي للنظافة عن طريق المراقبة البيولوجية.

الأهداف الفرعية

التعرف على المعلومات الخاصة بالمشاركين من اجل تفسير بعض نتائج الدراسة.

قياس نشاط الكولينستريز الي يعبر عن مدى تعرض المشارك للمبيدات من خلال تحليل الدم.

البحث عن وجود المبيدات وتحديد كميتها من خلال عينات البول والدم باستعمال تقنية الكروماتوغرافيا.

منهجية البحث

يتعلق الامر بدراسة استطلاعية لتقييم حالة التعرض المتكرر للمبيدات لدى العاملين في المكتب البلدي الصحي عبد

المراقبة البيولوجية. ستم الدراسة ابتداء من مارس الى حدود يوليوز 2019.

بعد الحصول على موافقة خطية من المشارك، سنواصل الإجراءات عبر ملاً استمارة حول المعلومات العامة الخاصة بالعامل بالمركز (العمر، الجنس، الطول، الوزن، ...)، التاريخ الطبي، تفاصيل عن التعرض للمبيدات (تحديد طبيعة العمل، ومدة الاتصال بالمبيدات...) وكذلك على وسائل الحماية والوقاية.

الخطوة الثانية هي جمع عينات الدم والبول التي سيتم جمعها في المكتب الصحي. ستنتقل العينات إلى مختبر مركز محاربة التسمم واليقظة الدوائية من أجل التحليل.

طريقة توصيل النتائج العامة للدراسة

بعد التأكد من النتائج، يتم تاريخها وتوقيعها وتوصيلها للطبيب المشرف بشكل فوري.

حقوق المشارك في هاته الدراسة

لديكم الحق في الاستغناء عن المشاركة في هاته الدراسة، ويمكنكم الرفض سواء قبل بداية الدراسة او في أي وقت تجدوه مناسباً ليكم.

سيطلب منكم توقيع موافقة خطية تعلنون فيها انكم حصلتم على كل المعلومات الخاصة بهذه الدراسة كتابة او شفويا. المشرف على الدراسة وطبيب المكتب الصحي رهن اشارتكم من اجل أي معلومة إضافية تجدونها مهمة للموافقة على المشاركة في الدراسة.

الفوائد المتوقعة

سيستفيد المشارك في هذه الدراسة من ثلاثة تحاليل مجانية، أي قياس نشاط الكولينستيريز وتحاليل أخرى لتحديد نوع الجزئية في العينات وهاته التحاليل تعتبر مكلفة مادياً للقيام بها.

سيحصل المشارك على جميع المعدات اللازمة لأخذ العينات في عين المكان يعني بالمكتب الصحي ولن يضطر إلى التنقل الى مكان اخر. وسيتمكن المشارك في النهاية من الحصول على نتائج التحاليل والتأكد من سلامته الصحية من ناحية تعرضه للمبيدات.

Annexe 6 : Fiche d'information Français

Fiche d'information au patient en Français

N.B :L'exemplaire est remis au patient par l'investigateur

Evaluation De L'exposition Chronique Aux Pesticides Chez Les Agents D'hygiène Du Bureau Communal D'hygiène (BCH) De La Région De Rabat, Salé, Kenitra

Mademoiselle, Madame, Monsieur,

J'ai le plaisir de vous proposer, Souad EL HAJJAJI, Professeur d'enseignement supérieur à la Faculté des Sciences de Rabat, de participer à une étude dont le Centre Antipoison et de Pharmacovigilance du Maroc (CAPM) est le promoteur. Veuillez, avant d'accepter de participer à cette étude, lire attentivement ces pages qui vous apporteront les informations nécessaires concernant les différents aspects de cette investigation. N'hésitez pas à poser toutes les questions que vous jugerez utiles au médecin du BCH.

Votre participation est entièrement volontaire. Si vous désirez ne pas prendre part de cette étude, vous le communiquer de façon direct au médecin du BCH ou à l'investigateur de l'étude.

☞ Nom, adresse, téléphone du promoteur :

Centre Antipoison et de Pharmacovigilance du Maroc.

Rue Lamfedel Cherkaoui, Mainate Al Irfane, BP: 6671, Rabat 10100, Maroc.

Tél : 05 37 77 71 69/ 05 37 77 71 67

☞ Nom et téléphone de l'investigateur :

-Professeur Souad EL HAJJAJI, 066103102

☞ Le but de l'étude :

- **Objectif général**

Evaluation de l'exposition chronique aux pesticides chez les travailleurs aux BCH par surveillance biologique.

- **Objectifs spécifiques**

- Etudier les caractéristiques épidémiologiques des travailleurs des BCH
- Mettre en évidence la présence de signes et symptômes d'intoxication aiguë ou chronique
- Réaliser un screening large des pesticide dans les échantillons sanguins et urinaires par méthodes chromatographiques (LC-MS/MS et GC-MS) au laboratoire du CAPM.

☞ Méthodologie :

Après avoir reçu le consentement écrit du travailleur, on va procéder à répondre à une fiche d'enquête sur les caractéristiques épidémiologiques du participant (Age, sexe, taille, poids,), des antécédents médicaux, les détails sur l'exposition (description du poste, durée de contact...) et aussi sur les moyen de protection et de prévention.

La deuxième étape est le prélèvement des échantillons sanguins et urinaire qui vont se faire au niveau du BCH.

Les échantillons vont être transportés vers le laboratoire du Centre antipoison et de pharmacovigilance du Maroc pour analyse.

↳ **Modalités de transmissions des résultats globaux de la recherche :**

Les résultats sont validés datées et signées puis rendus immédiatement au médecin.

↳ **Droits du patient participant à une étude :**

Vous pouvez refuser de participer à cette étude, également vous pouvez arrêter à tout moment votre participation à l'étude dans les mêmes conditions.

Le médecin vous demandera de signer un consentement écrit certifiant que toutes les informations concernant cette étude vous ont été données par écrit comme par oral.

Vous pouvez demander au médecin ou à l'investigateur toutes les informations complémentaires qui vous semblent utiles pour prendre votre décision en toute connaissance de cause.

↳ **Bénéfices attendus**

Les analyses faites dans cette étude ne seront pas à la charge des travailleurs.

Le participant aura tout le matériel nécessaire dans le BCH et il n'aura pas à se déplacer.

Au final, le participant sera en mesure d'obtenir les résultats de l'analyse et de s'assurer de son état d'exposition.

Résumé

Les intoxications par les pesticides représentent toujours un intérêt pour la santé publique dans le monde entier et particulièrement dans les pays en développement. L'objectif est de montrer l'apport des analyses chromatographiques dans les intoxications aiguës et chroniques par les pesticides chez la population marocaine. Deux travaux d'optimisation et de validation analytique de méthode de détection de pesticides ont été élaborés. De plus, deux études rétrospectives exploratoires ont été réalisées pour évaluer l'exposition aux pesticides chez des professionnels (agents d'hygiène et agriculteurs) et chez la population marocaine. Ceci par questionnaire et par le bio-monitoring en utilisant la mesure de l'activité cholinestérasique et l'analyse chromatographique par GC-MS et LC-MS/MS. Il s'agit de 453 analyses réalisées. Une détection de 19 pesticides par GC-MS et LC-MS/MS. Pour les intoxications aiguës, 50 % des cas sont des enfants âgés de 1 jour à 14 ans. Alors que chez les agents d'hygiène, 28% sont analphabètes et 62% utilisent au moins un seul moyen de protection contre les pesticides lors de la manipulation. Ils affirment que la durée de contact avec ces molécules varient entre 1 an et 36 ans. Pour les agriculteurs, 14% des participants ont été déjà hospitalisés à cause d'une intoxication par les pesticides. Ce travail contribue à mettre une alerte toxicologique dans le contexte des intoxications aiguës et chroniques aux pesticides. Une surveillance et sensibilisation régulières sont fortement recommandées chez la population marocaine pour savoir les bonnes pratiques d'utilisation de ces produits et prévenir les intoxications humaines. Une réglementation de rigueur doit également prendre place pour mieux réguler le marché parallèle des pesticides au Maroc.

Mots- clés : Pesticides, intoxication aigue, exposition professionnelle, activité cholinestérasique, GC-MS, LC-MS/MS.

Abstract

Pesticide poisoning continues to concern public health around the world and particularly in developing countries. The objective is to show the contribution of chromatographic analyzes in acute and chronic poisoning by pesticides among Moroccan population. Optimization and analytical validation of the pesticide detection method were developed. In addition, two retrospective studies were carried out to assess exposure to pesticides among professionals (hygiene officers and farmers) and among the Moroccan population, by using questionnaire and by bio-monitoring with cholinesterase activity measurement and chromatographic analysis by GC-MS and LC-MS/MS. It is 453 analyzes performed with a detection of 19 pesticides by GC-MS and LC-MS/MS. For acute poisoning, 50% of cases are children aged from 1 day to 14 years. Among hygiene officers, 28% are illiterate and 62% use at least one means of protection against pesticides when handling. They claim that the duration of contact with these molecules varies between 1 year and 36 years. For farmers, 14% of participants have already been hospitalized due to pesticide poisoning. This work helps to put a toxicological alert in the context of acute and chronic pesticide poisoning. Regular surveillance and awareness-raising are strongly recommended among the Moroccan population to learn about good practices for the use of these products and to prevent human poisoning. Strict regulations must also take place to regulate the parallel pesticide market in Morocco.

Key Words: Pesticides, acute poisoning, occupational exposure, cholinesterase activity, GC-MS, LC-MS/MS