



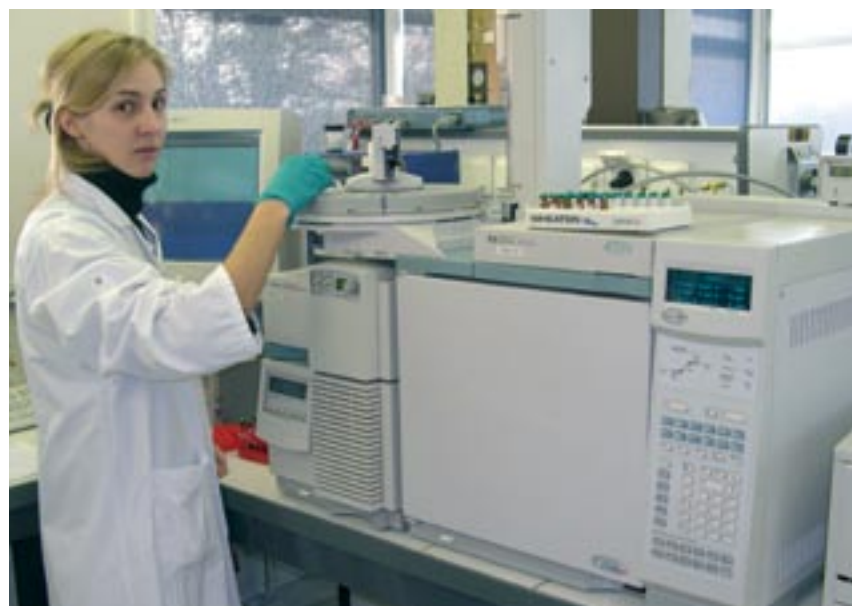
Marc COLIN* - Patrice MARCHAND**
Jean-Marc BONMATIN**

* Laboratoire de Pathologie Comparée, UMR
1231, Université de Montpellier II
Cc 101, Place Eugène Bataillon, 34 095
Montpellier Cedex 5.

** Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS
et Université d'Orléans,
45071 Orléans Cedex 2

Valeur et limite d'une analyse toxicologique

Approche simplifiée



Chromato en phase gazeuse

Dans ces dernières années, il a été beaucoup question d'analyses toxicologiques dans différentes « matrices » (terme employé par le chimiste spécialisé en analyse de résidus) comme les abeilles, le nectar, le pollen, la cire et aussi des matrices de l'environnement de la colonie d'abeilles (végétal, terre, eau, poussières, etc...).

Trop nombreux sont les exemples où elles représentent un bouclier scientifique derrière lequel se cachent parfois certaines mésinformations. Comme dans beaucoup de domaines, la transparence doit éclairer les conclusions des scientifiques. Il n'est pas sain que certains s'abandonnent à la facilité sous prétexte d'une Science compréhensible par quelques initiés seulement, surtout quand il s'agit de sauver un patrimoine vivant appartenant à tous les habitants de la planète.

LES COMMÉMORATIFS

L'analyse toxicologique commence sur le terrain. Généralement, le toxicologue qui va poser le diagnostic d'intoxication n'est pas présent sur le terrain au moment d'une intoxication ou lors du prélèvement des échantillons. Les agents de terrain chargés de ce travail ne se limitent pas à faire des prélèvements mais à décrire la situation et à expliquer pourquoi ils ont fait tel prélèvement plutôt que tel autre. Plus leur travail est minutieux et exhaustif, meilleure sera l'interprétation du bulletin d'analyses toxicologiques, car elle aura tenu compte de toutes les hypothèses et ainsi éliminé beaucoup d'incertitudes.

du bruit de fond, comme la partie visible de l'iceberg au-dessus d'une mer plus ou moins houleuse.

Le manipulateur évalue donc un seuil

- en-dessous duquel le signal caractéristique de la substance recherchée se confond avec le bruit de fond,
- au-dessus duquel le signal ne provient plus de la machine ou de la matrice mais de la substance à mesurer.

En reprenant la comparaison de l'iceberg, seuls ceux qui ont une certaine taille dépassent le niveau de la houle et seront identifiés sans aucun doute.

L'ANALYSE CHIMIQUE

La limite de détection

Quel que soit l'appareillage choisi pour l'analyse, il émet un bruit de fond enregistré par le détecteur. Pour pouvoir repérer une substance, il est nécessaire qu'elle émerge à un endroit bien précis au-dessus

La limite de quantification

Une fois que le signal est détecté sans ambiguïté, il faut mesurer son intensité avec précision. Le principe est alors d'injecter une gamme de quantités connues (supérieures à la plus petite quantité donnant un signal détectable). Pratiquement, on injecte la plus petite quantité détectée

puis on mesure l'intensité du signal. Ensuite, on injecte deux fois cette quantité et on mesure l'intensité du signal induit qui, théoriquement, devrait être deux fois plus fort que le précédent. Ce n'est pas toujours le cas, alors on injecte deux fois plus que précédemment et on mesure l'intensité du signal. A partir d'une certaine quantité injectée, l'intensité du signal est parfaitement proportionnelle à la quantité injectée (droite de régression valide à partir du 4^{ème} point aligné).

La limite de quantification est toujours supérieure à la limite de détection d'au moins un facteur trois, selon la directive européenne 96/23/CE.

Variations des limites

Selon les matrices (abeilles, pollen, nectar, cire ou autre), la substance est plus ou moins bien détectée et mesurée et donc, les limites de détection et de quantification ne sont pas toujours les mêmes.

Cependant, pour une même matrice, la limite de détection ainsi que la limite de quantification sont invariables quel que soit l'échantillon proposé à l'analyse pour un même protocole (extraction, purification, instrumentation d'analyse).

Purificateur

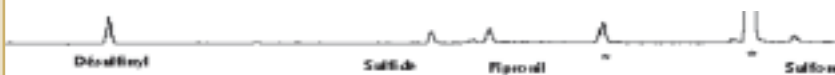


Trois exemples de chromatogrammes

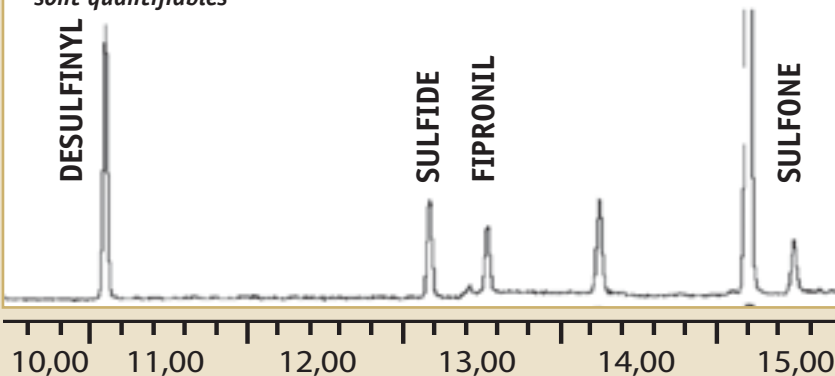
1. Bruit de fond de l'appareil : aucun signal n'est visible



2. Les pics caractéristiques du fipronil et de trois de ses métabolites **sont visibles** mais **non quantifiables**



3. Les pics caractéristiques du fipronil et de trois de ses métabolites **sont quantifiables**



COMMENT LIRE UN BULLETIN D'ANALYSES ?

Pour le chimiste analyste, il existe trois types de réponse :

1- La substance recherchée n'a pas été retrouvée car elle était en-dessous de la limite de détection de la méthode (par exemple 0,07 µg/kg de fipronil et 1 µg/kg d'imidaclopride dans la matrice pollen).

2- La substance recherchée a été détectée mais était inférieure à la limite de quantification. En reprenant l'exemple du fipronil dans le pollen, la substance (non quantifiée) est à une concentration supérieure à 0,07 µg/kg (limite de détection) mais inférieure à 0,2 µg/kg, (limite de quantification). Pour l'imidaclopride, les limites sont différentes, c'est-à-dire respectivement supérieure à 0,3 µg/kg (limite de détection) mais inférieure à 1 µg/kg (limite de quantification).

L'expérience a donc « vu » la substance avec certitude mais n'a pu la doser avec suffisamment de précision.

3- La substance recherchée a été dosée à une concentration supérieure à la limite de quantification.

Le travail du chimiste se termine presque ici ! Il se doit de vérifier la cohérence de tous les résultats et doit aussi relever les faiblesses et les forces de ses expérimentations.



COMMENT INTERPRÉTER UN BULLETIN D'ANALYSES ?

Au toxicologue d'intervenir maintenant :

1 - La substance recherchée n'a pas été retrouvée.

Il y a plusieurs explications :

- La substance était absente dans l'échantillon soumis à l'analyse, d'où la question essentielle qui met en cause la qualité du travail sur le terrain. Est-ce que l'échantillonnage a été bien fait en nombre et en qualité ?
- La substance était présente mais en trop faible concentration.
- La substance était présente mais elle s'est dégradée et est donc devenue « invisible ». Il peut s'agir d'un processus de métabolisation naturel mais aussi d'une dégradation de la substance pendant le transport ou le stockage. Certaines substances s'altèrent si rapidement qu'il est aussi pertinent de rechercher les produits de dégradation ou de métabolisation (les métabolites) que la molécule d'origine. C'est par exemple le cas pour le fipronil, l'imidaclopride, le thiaméthoxame, la clothianidine etc...

Cette remarque vaut indistinctement pour les métabolites toxiques (simple cumul des activités ou effets synergiques potentiels) et pour les métabolites non toxiques. Dans tous les cas, la concentration peut être interprétée comme la mémoire de la concentration initiale des précurseurs ou de la molécule mère (comme les mm d'eau dans un pluviomètre reflètent aussi bien la pluie, la grêle ou la neige).

CONCLUSION

Le bulletin d'analyses doit être clair, c'est-à-dire qu'il mentionne les limites de détection et de quantification de la méthode utilisée. Il doit aussi signaler les échantillons dont la concentration se situe entre la limite de détection et la limite de quantification, c'est-à-dire ceux où il y a présence de la substance sans qu'on puisse la quantifier. Pour qu'une analyse toxicologique soit pertinente, trois personnes doivent colla-

L'incertitude demeure de toutes façons : *substance réellement absente ou seulement « pas vue » ?*

2 - La substance est présente mais on ne peut la mesurer

Là encore, il y a plusieurs explications :

- La substance est effectivement en trop faible quantité pour être quantifiée.
- La substance était présente et en quantité mesurable mais elle s'est dégradée sans toutefois devenir « invisible ».
- Dans le cas de molécules comme le fipronil ou l'imidaclopride ou d'autres insecticides systémiques, l'analyse chimique peut révéler aussi la présence de métabolites toxiques, mais sans pouvoir les doser individuellement (en-dessous de la limite de quantification). Toutefois, la somme de tous ces métabolites et de la molécule parente pourrait dépasser la limite de quantification et ainsi avoir une signification toxicologique beaucoup plus forte. C'est déjà le cas, puisque la législation prend déjà en compte la somme de certains métabolites pour le fipronil.

De toutes façons, on a franchi un cap très important dans l'interprétation du phénomène car *on a éliminé l'hypothèse de l'absence de la substance*.

3 - La substance est présente et mesurable

On pourrait croire que la solution est ainsi donnée par le chimiste. Si cela était, il y aurait abandon des responsabilités incom-

bant au toxicologue. Celui-ci doit alors consulter à nouveau l'agent de terrain pour lever des incertitudes concernant l'adéquation entre ce qui est écrit sur le bulletin d'analyses et les constatations effectuées à l'occasion des prélèvements.

Parmi les précisions à apporter, on peut citer :

- la quantité de substance qui a pu être métabolisée de façon naturelle ou pendant le transport et le stockage,
- le choix et la qualité de l'échantillonnage sur le terrain. Par exemple, dans le cas d'une intoxication, les agents de terrain ne peuvent pas toujours garantir qu'ils ont bien prélevé les végétaux sur lesquels les abeilles sont allées butiner. Autre exemple, un seul prélèvement de pollen sur une ruche ne reflètera jamais l'activité de butinage d'un rucher et encore moins sur une période de plusieurs jours ou semaines.
- La quantité de substance retrouvée est-elle bien en relation avec le volume des pertes d'abeilles dans le cas d'une intoxication ? Il est alors normal que la quantité retrouvée soit très inférieure à la fameuse donnée de laboratoire: la dose létale 50 % « DL 50 », qui réfère à la toxicité aiguë, même si les pertes sont importantes. Inversement, les abeilles peuvent attirer des micro-particules toxiques par électrostatisme et ainsi concentrer le toxique sur leur cuticule.

La quantité mesurée par le chimiste sur le bulletin d'analyses est seulement une indication que le toxicologue se doit d'interpréter avec l'agent de terrain.

trappes). Cependant, l'assureur demandera à l'agent de terrain si la pluviométrie est due à la grêle, à la neige, à un orage suivi d'une inondation, à une journée particulièrement pluvieuse etc ... (équivalent au questionnement du toxicologue vers l'agent de terrain : activité des ruches, présence ou non d'un traitement phytosanitaire ; si oui, où, quand, comment ? etc ...). Encore une fois, seule une collaboration entre ces trois acteurs permet l'établissement d'un diagnostic sérieux.