

N° d'ordre : 36/2012-M/CH

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE
HOUARI BOUMEDIENE

Faculté de Chimie



MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de magister

EN CHIMIE

Spécialité : Chimie Organique appliquée.

Par

M^{elle} BOULAHLIB Soumia.

Thème

*Analyse de l'Atrazine, de la Propazine, de la
Simazine, de l'Isoproturon et de leurs métabolites
par HPLC/DAD et GC/MS*

Soutenu publiquement le : le 30/06/2012, devant le jury composé de :

M. A.BAALIOUAMER	<i>Professeur à l'U.S.T.H.B</i>	<i>Président</i>
M^{me} O.FERROUKHI	<i>Maitre de conférences / A à l'U.S.T.H.B</i>	<i>Examinatrice</i>
M^{me} D.HALLICHE	<i>Professeur à l'U.S.T.H.B</i>	<i>Examinatrice</i>
M.A.BOUDINA	<i>Maitre de conférences /A à l'U.S.T.H.B</i>	<i>Directeur de Mémoire</i>

Louange à Allah qui m'a accordé L'aboutissement de ce mémoire

A mes chers parents

A tous mes frères et sœurs

REMERCIEMENTS

*Ce travail a été réalisé au Laboratoire d'Analyse Organique Fonctionnelle de la Faculté de Chimie à l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (U.S.T.H.B.) sous la direction de Monsieur **A. BOUIDINA**, Maître de conférences A à la Faculté de Chimie de l'U.S.T.H.B, auquel je tiens à exprimer ma profonde gratitude pour avoir dirigé ce travail avec beaucoup de patience, pour sa compréhension, son aide précieuse ainsi que pour ses encouragements et pour la confiance qu'il m'a toujours témoignée.*

*Je tiens particulièrement à remercier Monsieur **A. BAALIOUAMER**, Professeur à l'U.S.T.H.B pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, pour son aide précieuse, ses encouragements et également d'avoir accepté de présider le jury de ce mémoire.*

*Je tiens à remercier vivement Monsieur **B. Y. MEKLATI**, Professeur et Directeur du C.R.A.P.C. pour son aide matérielle.*

*Je suis particulièrement reconnaissante à Madame **D. HALLICHE**, Professeur à l'U.S.T.H.B, qui m'a fait l'honneur d'examiner ce document et de faire partie du jury.*

*Je voudrais également adresser mes sincères remerciements à Madame **W.FEROUKHI**, Maître de Conférences A à l'U.S.T.H.B, pour avoir accepté de siéger au jury de ce mémoire.*

*Je remercie vivement Madame **K. LADJI**, Maître de conférences B et membre du laboratoire, pour les informations et l'aide précieuse qu'elle m'a apportée.*

*Toute ma gratitude va vers Monsieur **Y. FOUJIL-CHERIF**, Maître de Conférences A à l'U.S.T.H.B, pour ses conseils et son aide.*

*Je voudrais également remercier Monsieur **Y.BESSEKHOUD**, Maitre de conférences A à l'U.S.T.H.B, pour ses conseils et ses encouragements, sans oublier Monsieur **M.TRARI**, Professeur à l'U.ST.H.B pour son aide matérielle.*

J'exprime mes remerciements à, Monsieur A. Boumchhour, et M.A.Lemou ainsi qu'à tous les membres du LAOF et du CRAPC, pour l'aide et l'atmosphère qu'ils ont su créer et pour les encouragements qu'ils m'ont toujours manifestés.

Mes remerciements les plus chaleureux s'adressent à ma famille, je pense très fort à vous tous en écrivant ces mots et en particulier à mes parents, J'espère pouvoir un jour vous rendre un peu de tout ce que vous m'avez apporté. Merci de m'avoir toujours laissé libre dans mes choix et de m'avoir soutenue jusqu'au bout, c'est en grande partie grâce à vous que je suis arrivée là. Votre courage sera toujours un exemple pour moi.

Je tiens à remercier particulièrement Samira, Lamia, Assia, Lounis, Fatma, Oualid, Kamel, Gharib, Abedkader et Sofiane sur qui les quels j'ai toujours pu compter. Leurs bonnes humeurs, leurs sens de l'amitié et leurs énergies m'ont beaucoup aidée.

SOMMAIRE

Introduction	1
<i>Chapitre I :</i>	
<i>Généralités sur les pesticides</i>	
I.1. Introduction	4
I.2. Définition	4
I.3. Classification des pesticides	4
I.3. 1. <i>Premier système de classification</i>	5
I.3.2. <i>Second système de classification</i>	6
	7
I.4. Historique	
I.5. Devenir des pesticides dans l'environnement	10
I.5. 1. <i>Émission atmosphérique des pesticides</i>	10
I.5.2. <i>Dispersion des pesticides dans le sol</i>	11
I.5. 3. <i>Sorption adsorption dans le sol</i>	12
	12
I.6. Dégradation	12
I.6 .1. <i>La photodégradation</i>	12
I.6. 2. <i>La Biodégradation</i>	12
I.6. 3. <i>Dégradation chimique</i>	13
I.7. Dispersion dans l'eau	13
I .7.1. <i>Dégradation chimique des pesticides dans l'eau</i>	14
I.8. Effet sur la santé	14
I.9. Réglementation Algérienne	15

Chapitre II :

Méthode d'analyse des pesticides

II. Généralités sur les méthodes d'analyse des pesticides dans l'environnement	17
II.1.Introduction	17
II-2.Les méthodes d'extraction des pesticides dans l'eau	18
II.2.1. <i>Extraction Liquide-Liquide (LLE)</i>	18
II.2.2 <i>Extraction liquide-solide</i>	19
II.2.2.a. <i>Extraction en phase solide (SPE)</i>	19
II.2.2.b. <i>La micro -extraction en phase solide (SPME)</i>	19
II.3. Les méthodes chromatographiques d'analyse des pesticides	20
II.3.1.Historique	20
II.3.1.a. <i>Analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)</i>	21
❖ <i>Principe</i>	21
❖ <i>Les différents éléments constitutifs d'un système HPLC</i>	21
- <i>Réservoir de solvant</i>	22
- <i>la pompe</i>	22
- <i>Injecteur</i>	22
- <i>La Colonne et phase stationnaire</i>	22
- <i>Détecteur</i>	22
- <i>Système d'enregistrement et de détection</i>	22
II.3.1.b. <i>Analyse par chromatographie gazeuse</i>	23
❖ <i>Principe</i>	23
❖ <i>Les différents composants de la chromatographie gazeuse (GC)</i>	23
- <i>L'injecteur</i>	24
- <i>Le four et la colonne capillaire</i>	25

-Détecteur	25
II.4.Notion fondamentale de chromatographie	25
a- grandeurs de rétention	25
b- paramètre lié à l'efficacité	26
c -le facteur de séparation	26
d-Le facteur de résolution	26

Chapitre III

Analyse des pesticides par HPLC

II.1.Choix des pesticides utilisés	27
II.2. Mise au point de la séparation par HPLC	31
III.3.Protocole Expérimental	32
❖ Produits et réactifs	32
❖ Les solvants	32
❖ Appareillage	33
<i>II.3.1.Préparation de la phase mobile</i>	33
<i>III.3.2.Préparation des solutions</i>	34
<i>III.3.3.Préparation des échantillons d'eaux</i>	34
III.4.Résultats et discussions	35
III.4.Étude de l'Influences de la nature et la composition de la phase mobile	
sur les grandeurs chromatographiques	39
<i>a)Nombre de plateau théorique (N)</i>	39
<i>b) La sélectivité ()</i>	40
<i>c) la résolution (R)</i>	41
<i>d) Facteur de Capacité</i>	42

III.5.Analyse des pesticides dans l'environnement	43
Conclusion	51

Chapitre IV :

Analyse des pesticides par GC/MS

IV.1.Principe de la spectroscopie de masse	52
IV.2. Conditions d'analyse des pesticides par GC/MS en mode SIM	54
IV.3 Résultats et discussion	55
IV.4.Analyse et identification des pesticides	63
1-Echantillon de Ain-Taya	63
2-Echantillon de Bench bane	66
3-Echantillon de Birtouta	69
4-Echantillon de la station d'épuration de Boudouaou	72
5-Echantillon de Boufarik	75
6-Echantillon d'El-Kadous	78
Conclusion	81
Conclusion générale	82
Bibliographie	
Annexe	

Liste des abréviations :

HPLC/DAD: high performance liquid chromatography/ diode array detection

GC/MS: gaz chromatography/mass spectrometer ou chromatographie gazeuse/spectromètre de masse

K_d : coefficient de partage carbone organique/eau

K_{ow} : coefficient de partage octanol/eau

D_{T50} : temps de demi-vie

K_H : constante d'Henry

MO : matière organique

UV : ultra violet

LNH : lymphome non hodgkinien

LLE : liquid-liquid extraction ou extraction liquide-liquide

SPE : solid phase extraction ou extraction en phase solide

SPME : solid phase micro-extraction ou micro-extraction en phase solide

PMDS : polydiméthylsiloxane

CPG : chromatographie en phase gazeuse

t_m : temps mort

t'_R : temps de rétention réduit

t_r : temps de rétention

DEA : desethyl-atrazine ou atrazine desethyl

DIA : desisopropyl-atrazine ou atrazine desisopropyl

DDA : deethyl-disisopropyl atrazine ou atrazine deethyl disopropyl

DIHA : hydroxydeethylatrazine

OHDIA : 2-hydroxy desisopropyl atrazine ou atrazine desisopropyl-2-hydroxy

HA : hydroxyatrazine

DDA : dealkylated atrazine ou atrazine désalkylée

SIM : Selective ions monitoring ou sélection des ions



Introduction Générale

Les cultures subissent souvent d'importants dégâts occasionnés par divers organismes nuisibles. En l'absence de toute mesure de protection, les pertes de récolte dues aux agents pathogènes, aux ravageurs et adventices peuvent atteindre jusqu'à 80% de la production potentielle. Une telle perte aura de lourdes conséquences sur le plan social et économique à travers le monde et plus particulièrement dans les pays en voie de développement. Il a été donc plus qu'utile de rechercher et d'innover en matière de protection avec des produits naturels ou de synthèse.

Après la Deuxième Guerre Mondiale, l'usage de ces produits appelés communément pesticides ou encore produits phytosanitaires a connu un grand essor ; profitant du développement de la chimie organique, des centaines de molécules ont vu le jour. Au cours des décennies passées, ces intrants sont devenus quasiment indispensables à la plupart des systèmes de culture, en particulier les systèmes intensifs. De 1945 à 1985, la consommation mondiale des pesticides a doublé tous les dix ans [1]. Ainsi, depuis plus d'un demi-siècle, des quantités considérables de pesticides sont utilisées partout dans le monde, voire à une consommation annuelle estimée à 2.5 millions de tonnes.

Malgré leurs contributions reconnues pour la protection des cultures, les pesticides soulèvent aujourd'hui quelques craintes quant à leurs impacts sur l'homme et l'environnement. En effet, le risque potentiel sur la santé humaine s'est avéré à travers la détection des résidus de pesticides dans les denrées alimentaires [2-4] , le sol [5-7], l'air [8-13], et même dans l'eau [11,12]. Il apparaît donc nécessaire de développer une étude sur l'analyse des pesticides dans l'environnement et plus particulièrement l'eau afin de répondre aux exigences et aux normes instaurées par les différentes instances de protection de l'homme et l'environnement.

Dans ce travail nous nous proposons de rechercher les conditions optimales de l'analyse de quelques pesticides dans les eaux par chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diode (HPLC/DAD), ainsi qu'une analyse complémentaire par chromatographie gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC/MS). Afin de les appliquer à des échantillons d'eaux de drainage provenant de cinq zones agricoles (El-kadous, In-Taya, Boufarik, Birtouta et de Benchâbene) ainsi qu'une eau issue de la station dépuratoire de Boudouaou.

Nous aborderons ce thème en quatre chapitres :

A la suite d'une introduction générale, le premier chapitre sera consacré à une étude bibliographique qui consiste en une synthèse des connaissances sur les pesticides en général : leurs utilisations, classifications, leurs devenir dans l'environnement ainsi que leurs effets sur la santé humaine.

Le deuxième chapitre est un complément de la partie synthèse bibliographique, il est consacré aux méthodes d'analyse des pesticides dans l'eau.

Le troisième chapitre quant à lui, sera consacré à l'optimisation d'une analyse chromatographique liquide à haute performance muni d'un détecteur à barrette diode (HPLC/DAD) en vue d'analyser des échantillons environnementaux.

En fin, le quatrième chapitre présente une analyse complémentaire sur les trois pesticides à savoir : l'Atrazine, la Simazine et l'Isoproturon par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC/MS).

Le mémoire est enfin complété par une conclusion générale récapitulant les résultats obtenus et des perspectives.

Chapitre I :

Généralités sur les pesticides

A decorative graphic consisting of a thin vertical line on the left and a thin horizontal line on the right, intersecting at a point below the main title.



Qu'est-ce donc qu'une mauvaise herbe, sinon une plante dont on n'a pas encore découvert les vertus ?

Ralph Waldo Emerson.

I.1. Introduction :

Depuis la révolution industrielle, l'exploitation des terres agricoles s'intensifie au même rythme que la croissance exponentielle de la population mondiale. La mécanisation et le développement des techniques de travail ont favorisé une production et un rendement agricole répondant à une demande de plus en plus forte. En plus de cette avancée technologique, l'agriculture se dote aujourd'hui de produits chimiques très performants afin de lutter contre tout parasite pouvant nuire aux cultures [14].

I.2. Définition :

Le terme pesticide est composé du suffixe «-cide» qui a pour origine le verbe latin «*caedo, cadere*» qui signifie «*tuer*» et de la racine anglaise *pest* qui désigne tout animal ou plante susceptible d'être nuisible à l'homme et à son environnement [15]. Il regroupe toutes les substances naturelles ou de synthèses capables de contrôler, d'attirer, de repousser, de détruire ou de s'opposer au développement des organismes vivants (microbes, animaux ou végétaux considérés comme indésirables pour l'agriculture, l'hygiène publique et la santé [16].

Actuellement, il existe de nombreuses autres appellations des pesticides telles que produits phytosanitaires, produits agropharmaceutiques, produits antiparasitaires ou encore produits de protection des cultures. Notons que toutes ces expressions peuvent aussi bien désigner les substances actives (molécules) responsables de l'action visée que les formulations commerciales. Celles-ci sont constituées d'un mélange de deux ou de plusieurs substances, dont au moins une substance active et un adjuvant (support de solvant pouvant présenter les mêmes risques de toxicité que les matières actives).

I.3. Classification des pesticides :

Les pesticides peuvent être groupés de différentes manières :

- Par fonction de la nature de l'espèce à combattre (1^{er} système de classification) ;
- En fonction de la nature chimique de la substance active qui les compose (second système de classification).

I.3. 1. Premier système de classification :

Le premier système de classification repose sur le type de parasites à contrôler. Il existe principalement trois grandes familles que sont les *Herbicides*, les *Fongicides* et les *Insecticides*.

Les *Herbicides* représentent les pesticides les plus utilisés dans le monde, ils sont destinés à éliminer les végétaux rentrant en concurrence avec les plantes à protéger en ralentissant leurs croissances c'est pourquoi ils sont utilisés pour l'entretien des voiries ainsi que pour le jardinage des particuliers. Les herbicides possèdent différents modes d'action sur les plantes, ils peuvent être des perturbateur de la régulation d'une hormone « l'auxine » (principale hormone agissant sur l'augmentation de la taille des cellules), de la photosynthèse, ou encore comme inhibiteurs de la division cellulaire [17].

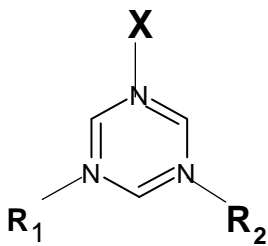
Les *Fongicides* permettent quant à eux de combattre la prolifération des maladies des plantes provoquées par des champignons ou encore des bactéries, ils peuvent agir différemment sur les plantes soit en inhibant le système respiratoire ou bien la division cellulaire, soit en perturbant la biosynthèse des acides aminés et des protéines [17].

Les *Insecticides* sont utilisés pour la protection des plantes contre les insectes ils interviennent en les éliminant ou en empêchant leur reproduction. Différents types existent à titre d'exemple, les régulateurs de croissances et ceux agissant sur la respiration [17].

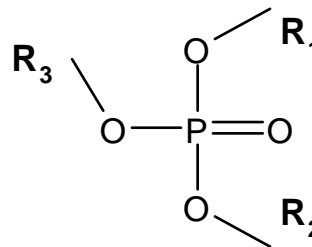
Outre ces trois grandes familles mentionnées ci-dessous d'autres peuvent être citées en exemple : les acarides contre les Acariens, les Nématocides contre les vers ; les Rodonticides contre les rongeurs etc.....

I.3.2. Second système de classification :

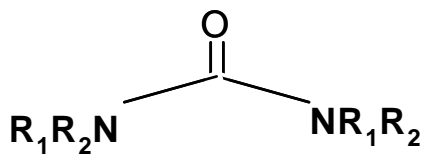
Le deuxième système de classification tient compte de la nature chimique de la substance active qui compose majoritairement les produits phytosanitaires. Compte tenu de la variété des propriétés physico-chimiques des pesticides disponibles sur le marché, Il existe un très grand nombre de familles chimiques parmi eux on trouve les *organochlorés*, les *carbamates*, les *triazines* ainsi que les *urées* [18]. Les structures chimiques de quelques familles sont représentées dans la *Figure I.1*.



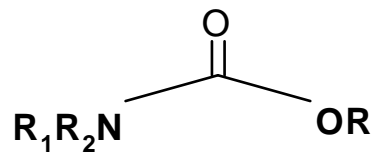
Triazines



Organophosphorés



Urées



carbamates

Figure I.1 : Structures chimique de quelques familles de pesticides.

I.4.Historique:

Depuis très longtemps, les malheurs survenus aux cultures étaient attribués à une punition divine ou à un sortilège et il n’y avait d’autres remèdes que les prières ou la magie. Au fil du temps, des moyens artificiels ont été mis en place pour contrôler la prolifération des espèces nuisibles envers les cultures. Les premiers pesticides utilisés étaient des dérivés de composés minéraux [17,18], puis à partir de la Seconde Guerre mondiale les pesticides ont bénéficié du développement de la chimie organique qui n’a cessé de proposer de nouvelles molécules plus efficaces même à faible dose, le tableau suivant résume le développement des substances actives des pesticides durant le siècle dernier.

Tableau .1 : Développement des substances actives des pesticides [19].

	Herbicides	Fongicides	Insecticides
Avant 1900	Sulfate de cuivre, Sulfate de fer	Soufre, Sel de cuivre	Nicotine
1900	Acide sulfurique	–	Sel d’arsenic
1900-1920	Colorant nitrique	–	–
1920-1940	phytohormones	–	Organochlorés, Organophosphorés
1950-1960	Triazines,Urée substitués,carbammates	Dithiocarbammates, Phtalimides	Carbammates
1960-1970	Dipyridyles,Toluidines	Benzimidazoles	–
1970-1980	Amino-phosphonates, Propionates...	Triazoles, Dicarboximides, Amides, Phosphites, Morholines	Pyréthrinoïdes, Benzoyl-urées
1980-1990	Sulfonyl urées	–	–
1990-2000	–	Phénylpyrroles, Strobilurines	–

I.5. Devenir des pesticides dans l'environnement :

Connaître le devenir des produits phytosanitaires après leur épandage en zone agricole est une nécessité, car la pollution engendrée par ces matières actives peut avoir des conséquences graves sur la santé et l'environnement [20]. En effet, les pesticides peuvent se disperser dans différents compartiments de l'environnement (eau, sol, air) et en fonction de leurs propriétés physico-chimiques telles que [17, 21, 22] :

- ✓ La pression de vapeur saturante (unité de pression à une température donnée), renseignent sur la volatilité d'un produit et sa constante d'Henry K_H (en $\text{pa.m}^3/\text{mol}$), évaluant ainsi la répartition dans les phases gazeuses et liquides ;
- ✓ Le caractère hydrophile : la solubilité dans l'eau (en mg/l) ;
- ✓ Le coefficient de partage Sol/Eau (K_d), il donne une indication sur l'aptitude d'une molécule à être adsorbée sur une masse du sol ;
- ✓ Le coefficient de partage carbone organique/eau K_{oc} : où $K_{oc} = K_d / \%C_{org}$. Ce coefficient donne une indication sur la répartition des pesticides entre la solution et la fraction organique insoluble du sol ;
- ✓ le coefficient de partage octanol/eau (K_{ow}), il rend compte de la tendance d'une molécule à s'accumuler dans les membranes biologiques des organismes (plus il est grand plus la molécule a tendance à s'accumuler dans l'organisme);
- ✓ la réactivité biologique, chimique, et photochimique du pesticide ;
- ✓ le temps de demi-vie D_{T50} : durée au bout de laquelle la moitié de la substance initialement introduite est dégradée. Cette propriété donne une indication sur le temps de persistance des pesticides dans l'environnement.

Ces propriétés combinées avec le taux de pesticide appliqué et entrant dans l'environnement peuvent indiquer la distribution de ces derniers dans les différents compartiments environnementaux (eau, sol, air, plantes). La *Figure I.2*. Présente les différentes voies de transport et le devenir des pesticides dans l'écosystème [17].

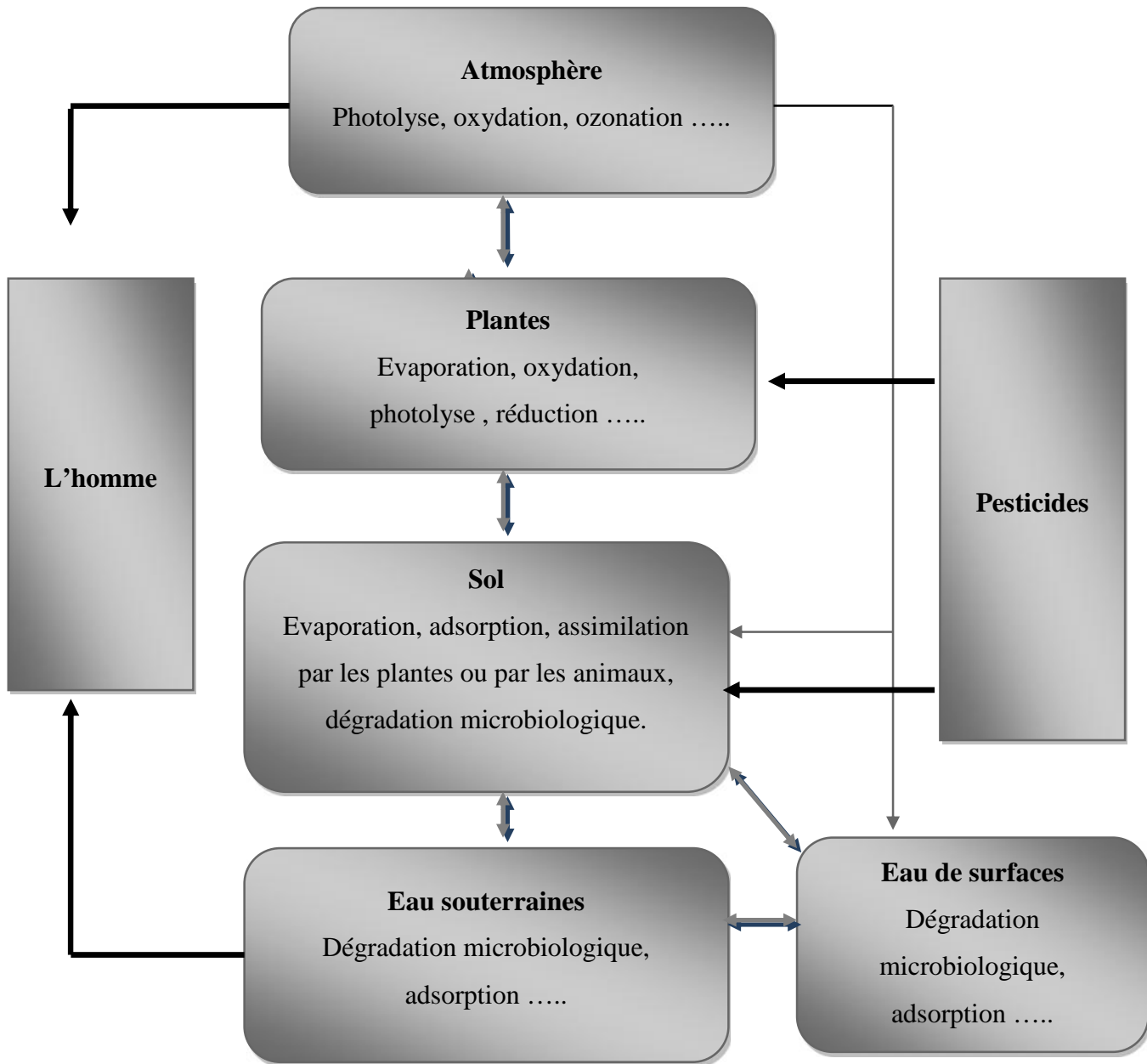


Figure I.2 : Devenir des pesticides dans l'environnement.

1.5. 1. Émission atmosphérique des pesticides :

Les pesticides entrent dans l’atmosphère soit par dérive au moment du traitement ou bien par volatilisation à partir des plantes ou du sol après leur application. L’importance de la dérive dépend essentiellement de la méthode d’application (technique et équipement) ainsi que du type de formulation (granulés, suspension concentrée...), le phénomène de volatilisation quant à lui est en grande partie contrôlé par les conditions météorologiques aux moments du traitement, à titre d’exemple une température élevée va augmenter le pourcentage des produits volatiles [21,23]. Afin de quantifier la perte des pesticides par volatilisation les chercheurs se réfèrent le plus souvent à la constante d’Henry (K_H). Le **Tableau 1.2** présente les valeurs relatives de cette constante pour les pesticides étudiés. Les produits ayant une valeur de (K_H) supérieure à $3.3 \cdot 10^{-3}$ sont considérés comme étant volatiles [24].

Tableau 1.2 : Constantes de vaporisation des pesticides étudiées [25].

Matière active	Tension de vapeur (Pa)	Constante d’Henry (Pa. l /mg)
Atrazine	$3,99 \cdot 10^{-5}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$
Simazine	$8,11 \cdot 10^{-5}$	$1,62 \cdot 10^{-5}$
Isoproturon	$8,1 \cdot 10^{-5}$	$1,46 \cdot 10^{-5}$
Propazine	$4 \cdot 10^{-5}$	$1,79 \cdot 10^{-4}$
Terbutylazine	$4 \cdot 10^{-5}$	$3.24 \cdot 10^{-3}$

I.5.2. Dispersion des pesticides dans le sol :

Le devenir des pesticides dans le sol est directement lié à la notion de persistance. La persistance est définie par le temps de résidence d'un composé dans un compartiment défini elle dépend essentiellement [11] :

- ✓ Des propriétés chimiques du produit : volatilisation, présence ou absence de groupement réactionnelle... etc.
- ✓ De la morphologie du sol : structures, type et quantité d'argiles, pourcentage de la matière organique (MO), substance humique, pHetc.
- ✓ Du mode d'application, le taux d'application, la superficie du sol traité, de la période d'applicationetc.
- ✓ Des conditions climatiques : intensité et fréquence des pluies, température du sol....etc.

Arrivés aux sols, les produits phytosanitaires sont soit dégradés (chimiquement, biologiquement), soit dispersés, ou bien retenus. Leurs matières actives peuvent se volatiliser, ruisseler ou être lessivées et atteindre les eaux environnantes ou les eaux souterraines. Elles peuvent aussi être adsorbées par les particules du sol, les plantes ou des organismes vivants. La **Figure I.3** présente le comportement des pesticides dans le sol.

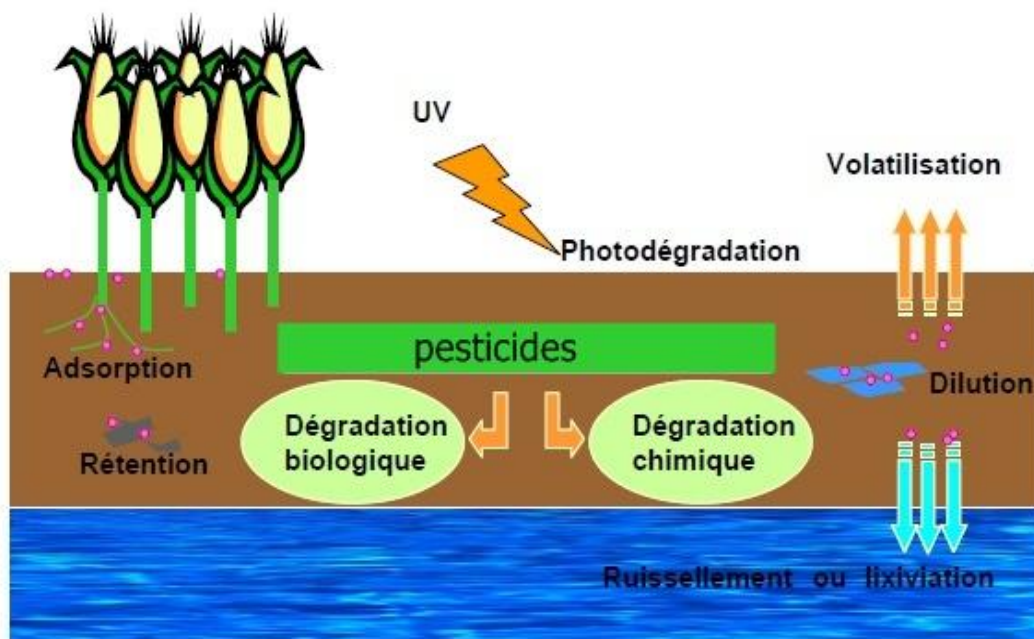


Figure I.3: Comportement des pesticides dans les sols.

1.5.3 .Sorption adsorption dans le sol :

Les phénomènes de sorption (absorber, adsorber) des pesticides dans le sol sont complexes et dépendent principalement des propriétés physico-chimiques du produit et de la composition du sol [17]. En effet, les minéraux (Argiles, Oxydes, Hydroxydes) et la matière organique (MO) peuvent aider à retenir les composés organiques dans le sol [26,27].

1.6. Dégradation :

La dégradation d'un pesticide se produit quand ce dernier est décomposé générant plusieurs sous produits appelés métabolites et éventuellement H₂O, CO₂, CH₄ à travers des réactions photochimiques, chimiques ou biologiques.

1.6.1. La photodégradation :

Les réactions photochimiques sont initiées par les rayons Ultra violet (UV) provenant du soleil. La photolyse en général transforme les pesticides en produits moins toxiques. Les études sur la photodégradation des pesticides se font généralement sous lampes UV et le taux de photodégradation dépend de plusieurs paramètres comme la durée d'application, le pH, la concentration des pesticides...etc [28].

1.6.2. La Biodégradation :

La dégradation biologique est assurée principalement par des micro-organismes, par conséquent son taux dépend de la population microbienne. Dans des conditions données, la dégradation peut être maximisée par un taux d'humidité élevé et une grande teneur en matière organique et de la chaleur [29]. La biodégradation des phytosanitaires suit généralement une cinétique d'ordre 1 qui peut être exprimée de la manière suivante [30] :

$$C_t = C_0 \times e^{-kt} . \quad (1)$$

Avec C_t = Concentration des phytosanitaire aux temps t.

C_0 = Concentration des phytosanitaire aux temps t_0 .

k = Constante d'ordre 1 exprimée en jour⁻¹.

t = temps en jours.

Le temps de demie-vie encore appelé DT50 correspond à la durée nécessaire pour laquelle 50 % de la quantité appliquée soit dégradée. Ce paramètre est relié à la constante de dégradation par la relation ci-dessous [30].

$$DT50 = \text{Ln } 2 / k . \quad (2).$$

I.6. 3. Dégradation chimique :

La dégradation chimique est une décomposition suite à des réactions d'hydrolyse (réaction avec l'eau), oxydation (réaction avec l'oxygène) ou des réactions de substitution nucléophile par des groupements actifs présents dans la matière organique [31]. Ces mécanismes en concurrence avec le processus de la biodégradation dans les premiers centimètres du sol sont plus importants dans les couches profondes où la population microbienne est minime.

I.7. Dispersion dans l'eau :

La dispersion des pesticides dans les eaux peut engendrer une pollution et nuire ainsi à la richesse écologique. Cette pollution diffuse est liée à l'entraînement de ces produits par transfert en surface ou en profondeur des eaux d'irrigation ou de pluies vers les fleuves, les lacs, ou encore les océans. Les pesticides peuvent se transférer dans l'eau soit horizontalement ou verticalement [32]. La *Figure I.4* résume les différents aspects de transfert des pesticides vers les eaux.

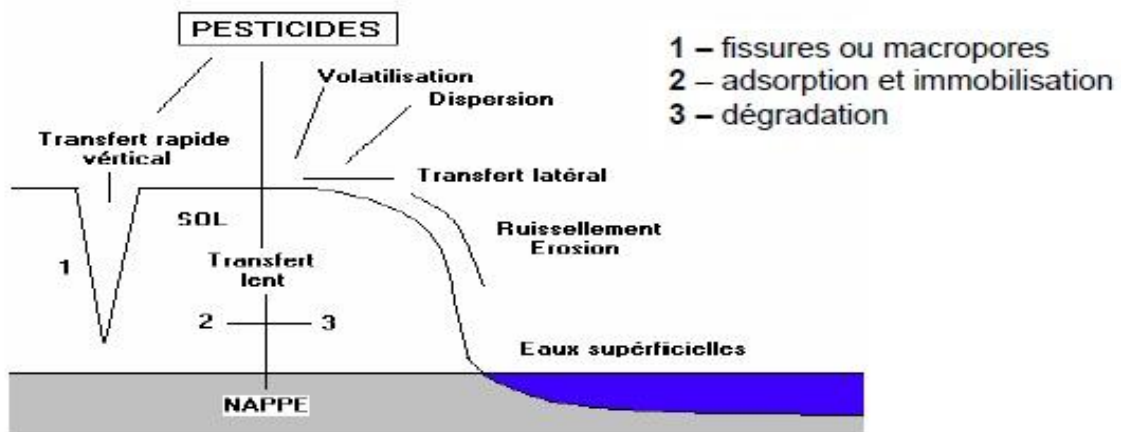


Figure I.4: Transfert des pesticides en milieu aqueux.

1.7.1. Dégradation chimique des pesticides dans l'eau :

Quelque soit le mode d'utilisation, la plupart des pesticides employés atteignent les eaux de surface et souterraines [22]. Leurs molécules peuvent être soumises à des réactions d'oxydoréduction, d'hydrolyse qui sont fonction de leur persistance. Le **Tableau I.5** présente la persistance de quelques familles de pesticides dans l'eau.

Tableau I.3: Persistances de familles des pesticides dans l'eau.

<i>Famille de pesticides</i>	<i>Persistances</i>
<i>Organochlorés</i>	<i>2 à 5 ans</i>
<i>Dérivées de l'urée</i>	<i>4 à 10 mois</i>
<i>Triazines</i>	<i>3 à 18 mois</i>
<i>Amides</i>	<i>2 à 10 mois</i>
<i>Niriles</i>	<i>4 mois</i>
<i>carbamate</i>	<i>2 à 8 semaines</i>
<i>Organophosphorés</i>	<i>7 à 84 jours</i>

1.8. Effet sur la santé :

Si les pesticides ont d'abord apparu bénéfiques, leurs effets néfastes ont été peu à peu mis en évidence [33,34]. Ces produits nécessaires pour la protection des cultures se sont avérés toxiques à différentes échelles. La contamination par ces produits peut se faire par différentes voies, transmis dans les aliments, dans l'eau, par contact avec la peau ou encore par inhalation. Certains composés de toxicité aiguë peuvent être éliminés facilement par l'organisme ; à l'inverse d'autres composés de toxicité moindre qui peuvent s'accumuler dans l'organisme et induire à un effet de contamination long terme.

D'une manière générale, il a été montré que les pesticides peuvent causer des désagréments pour la santé comme les troubles de la reproductibilité, du développement du système nerveux [35]. L'exposition aux pesticides peut être aussi la cause du développement de cancer [15]. Le **Tableau I.4** montre les effets de quelques pesticides sur la santé.

Tableau I.4 : Effets de quelques pesticides sur la santé humaine.

Type d'affection	Nature de l'affection
Lymphome Non Hodgkinien (LNH) (groupements de cancer qui prennent naissance dans les cellules du système lymphatique).	Plusieurs études prouvent des corrélations entre des herbicides spécifiques (2,4-D) et l'apparition du LNH [36]. Des études mettent en évidence une corrélation entre l'exposition à l'Atrazine et l'apparition du LNH [37].
Leucémie (cancer du sang)	Des études ont montré une corrélation entre l'utilisation des herbicides Atrazine le (2,4D) et la leucémie [38].
Tumeur du cerveau	Il a été montré qu'une exposition aux pesticides utilisés dans les vignes est une des causes de mortalité par le cancer du cerveau [38].
Cancer gastro-intestinaux	L'exposition aux pesticides organochlorés est liée à une variété de cancer gastro-intestinaux. Les professionnelles exposées à la DDT ont jusqu'à 70 % de risque de développer le cancer du pancréas [39].

1.9. Réglementation Algérienne :

L'encadrement des risques liés à l'exposition et l'utilisation des substances chimiques en agriculture repose sur l'enregistrement et le contrôle par les services du gouvernement conformément aux dispositifs législatifs et réglementaires mise en place [40] :

- La loi 87-17 du 1^{er} août 1987 relative à la protection des phytosanitaires.
- La loi 09-03 du 25 février 2009 relative à la protection du consommateur et à la répression des fraudes.
- Le Décret exécutif 95-405 du 2 décembre 1995 relatif aux contrôles des produits phytosanitaires à usage agricole, modifié et complété par le décret exécutif 99-156 du 20 juillet 1999.

À travers ces différentes études, il semble clair que les pesticides constituent un danger qui guette la santé humaine en permanence. La protection des consommateurs est donc plus que nécessaire. C'est pourquoi des réglementations portant sur le taux de pesticides ont été édictés par les directives européennes (EU directives 98/83/EC) qui fixent le taux de tolérance de ces produits dans l'eau à 0.1µg/l par substance (à l'exception de l'aldrine, de la dieldrine, de l'heptachlore et de l'époxyde heptachlore pour lesquels la norme est de 0.03µg/l) et de 0.5µg/l pour la somme des pesticides et métabolites trouvés. Il est donc plus que nécessaire de développer des méthodes d'analyse afin de quantifier ces produits dans l'environnement et plus particulièrement dans l'eau.

Chapitre II

Méthodes d'analyse des pesticides

A decorative graphic consisting of a thin vertical line on the left and a thin horizontal line on the right, intersecting at a point below the chapter title.

II. Généralités sur les méthodes d'analyse des pesticides dans l'environnement :

II.1.Introduction:

L'analyse des traces dans les eaux, en particulier celles des pesticides, constitue une tâche dont la difficulté est souvent sous-estimée. La grande diversité des pesticides et leur faible concentration exigée par la réglementation et la complexité des matrices rendent, le suivi analytique au niveau de l'environnement très difficile nécessitant ainsi des outils analytiques spécifiques et performants. Toutefois, il existe différentes étapes préalables de traitement de l'échantillon avant l'analyse [41]. Le processus analytique global d'analyse des pesticides est schématisé dans la *Figure II.1*.

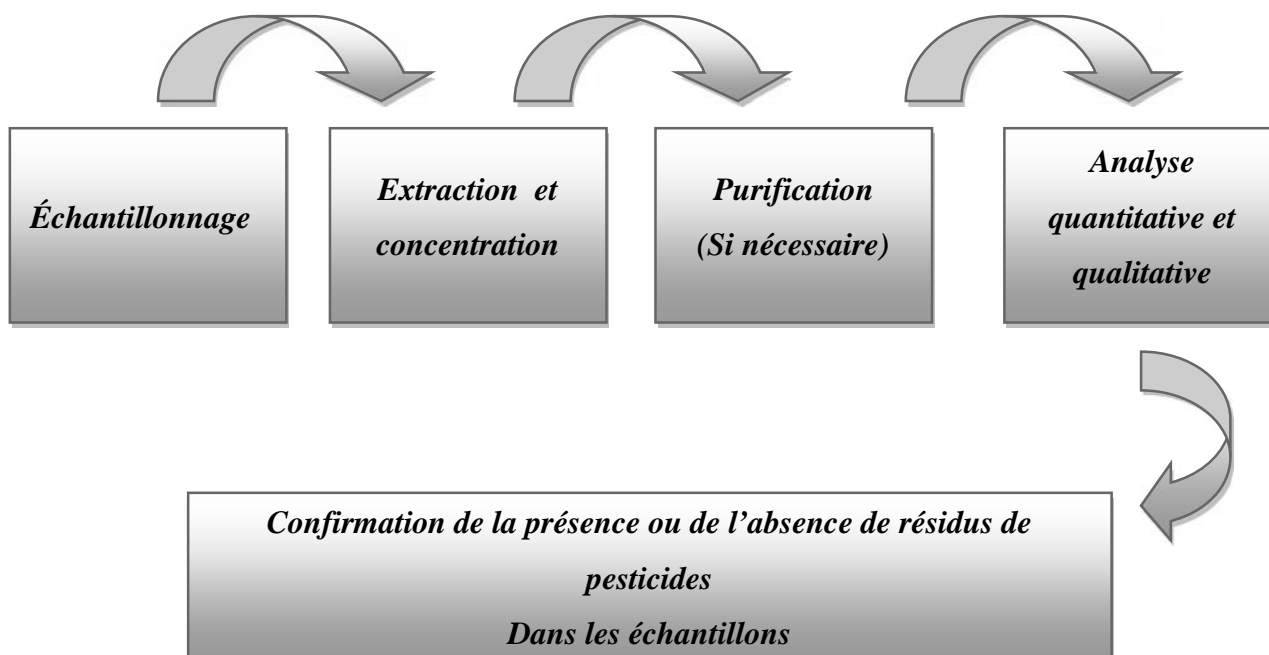


Figure II-1 : Principales étapes d'une procédure analytique utilisée pour la détermination de résidus de pesticides dans l'environnement.

II-2. Les méthodes d'extraction des pesticides dans l'eau :

L'échantillon d'eau provenant de l'environnement contient souvent une quantité infime de pesticides de l'ordre de ppb: $\mu\text{g/l}$ ou même ppt : ng/l . Il convient donc de les extraire de la matrice dans laquelle ils sont inclus, il existe pour cela deux principales méthodes d'extraction : l'extraction liquide/liquide et l'extraction liquide /solide.

II.2.1. Extraction Liquide-Liquide (LLE) : c'est la technique la plus ancienne elle est basée sur le principe d'une distribution des substances phytosanitaires entre la phase aqueuse et un solvant organique non miscible à l'eau, le choix du solvant s'opère parmi une large gamme de solvant de polarité et de densité variables au dépend de la molécule à extraire. Pour les composés semi-volatiles, on utilise généralement l'hexane, l'étylacetate, et le dichloromethane [42-45]. La **Figure II.2** présente le schéma d'une extraction liquide-liquide.

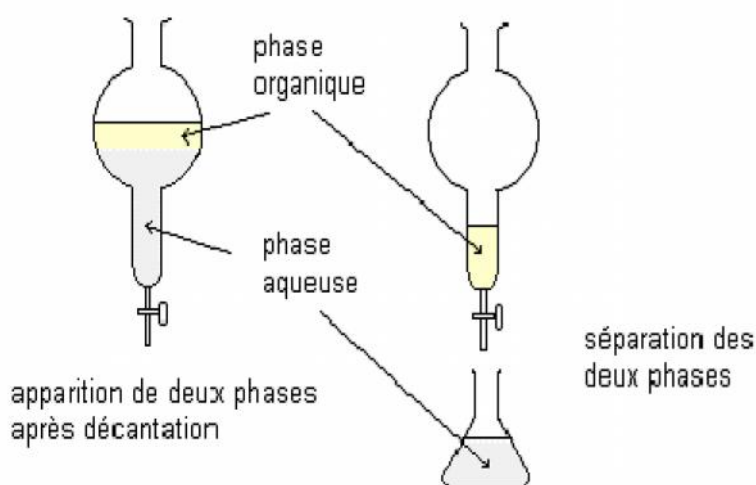


Figure II.2: Méthode d'extraction en phase liquide (LLE).

II.2.2 Extraction liquide-solide :

II.2.2.a. Extraction en phase solide (SPE) :

La technique consiste à percoler l'échantillon d'eau (0.5 à 1 litre) dans un corps de seringue remplie de phase absorbante. Les pesticides sont ainsi retenus sur l'adsorbant, puis récupérés par élution avec un petit volume de solvant adéquat [46-48]. La *Figure II.3* présente les différentes étapes de l'extraction en phase (SPE).

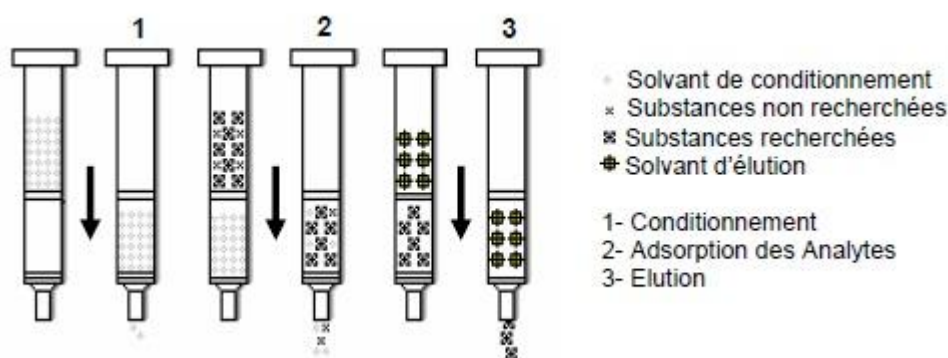


Figure II.3: Méthode d'extraction en phase solide (SPE).

II.2.2.b. La micro -extraction en phase solide (SPME) :

Cette méthode repose sur l'adsorption des composés présents dans un faible volume d'eau sur une fibre imprégnée d'une micro-couche de phase solide [49-51].

La nature de l'adsorbant diffère selon la nature de molécule à extraire :

- Le polydiméthylsiloxane (PDMS) pour les substances apolaires ou faiblement polaires (pesticides organochlorés, organophosphorés...);
- Le polyacrylate pour les substances polaires (pesticides organophosphorés, phénol);
- La phase copolymérique vinyl/divinylbenzene pour les triazines et triazoles.

Cette technique est associée à la chromatographie gazeuse sans aucune étape intermédiaire.

La *Figure II.4* présente les différentes étapes d'une micro-extraction en phase solide.

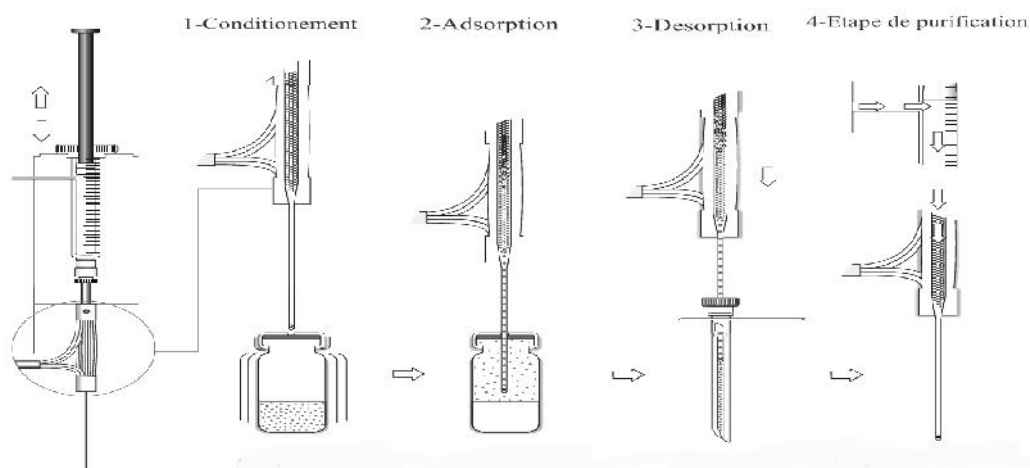


Figure II.4 : Différentes étapes d'une micro-extraction en phase solide (SPME).

II.3. Les méthodes chromatographiques d'analyse des pesticides :

Les pesticides sont caractérisés par leur diversité notamment concernant leurs propriétés physico-chimiques et leurs faibles concentrations dans les échantillons d'eau, ainsi le suivi analytique de ces produits reste complexe et demande des techniques d'analyses spécifiques et performantes.

Face à ce défi analytique considérable, plusieurs méthodes biochimiques, colorimétriques, biologiques sont en cour d'utilisation [52-54], mais les techniques chromatographiques demeurent les plus pratiquées pour l'analyse des résidus de pesticides dans les différentes matrices de l'environnement. En effet, la chromatographie en phase liquide ou gazeuse couplée à des détecteurs spécifiques à haute sélectivité et résolution offre une technique puissante pour la détection et la quantification formelle de la plupart des contaminants organiques dispersés dans l'environnement.

II.3.1. Historique :

Bien que certain font remonter l'origine de la chromatographie jusqu'à l'Antiquité, on retient généralement, les travaux du botaniste russe Tswett (1903), qui en sépara les pigments de la chlorophylle sous forme d'anneaux colorés sur une colonne remplie de carbonate de calcium. Depuis, Cette méthode s'est considérablement améliorée donnant naissance à de nouvelles techniques plus performantes [55].

Dans ce qui suit nous n'aborderons que deux méthodes d'analyse chromatographique.

II.3.1.a. Analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) :

❖ Principe :

La chromatographie liquide à haute performance HPLC permet d'analyser des composés thermostables et peu volatiles. Ce type de chromatographie repose sur la séparation des composés dans un liquide appelée *phase mobile* qui progresse dans un support (*colonne*) contenant un matériau de fine granulométrie appelée *phase stationnaire*. La séparation s'opère suivant des interactions chimiques ou physiques des analytes avec la phase mobile ainsi qu'avec la phase stationnaire, et chaque constituant adopte une vitesse de migration qui lui est propre. A la sortie de la colonne les composés seront détectés par un détecteur approprié.

Actuellement cette technique est couplée à divers détecteurs (UV, Spectrométrie de Masse, Raisonance Magnétique.....).

❖ Les différents éléments constitutifs d'un système HPLC :

Une installation chromatographique comporte plusieurs modules qui sont reliés par des tubulures courtes et de très faibles diamètres (environ 0.1mm) qui résistent à la forte pression et aux solvants usuels. La *Figure II.3.a* présente le schéma d'un système HPLC.

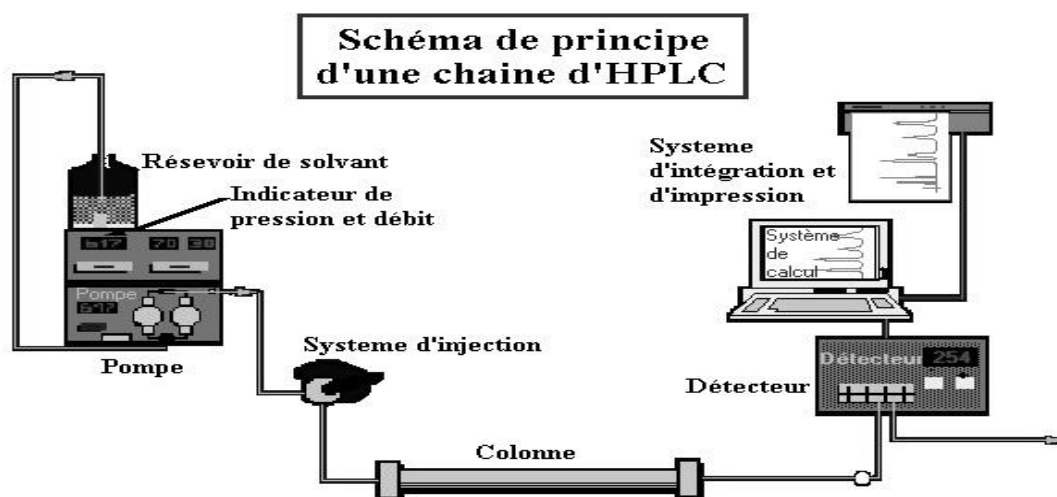


Figure II.5: Les différents composants d'un système HPLC.

Un système HPLC est composé de [56]:

- **Réservoir de solvant :** Ce sont des bouteilles en téflon contenant la phase mobile qui peut être composée d'un ou d'un mélange de solvants. La polarité de la phase mobile dépend essentiellement de la polarité de la phase stationnaire ce qui permet de distinguer deux différents modes :

Si la phase stationnaire est polaire, on utilisera une phase mobile peu polaire. La chromatographie est dite en *phase normale*. Si la phase stationnaire est très peu polaire, on utilisera une phase mobile apolaire. Par opposition on dit que la chromatographie est à *phase inversée*.

- **la pompe :**

Tout système HPLC. Comporte une ou plusieurs pompes débitmétrique afin de forcer le passage de la phase mobile dans la colonne et de maintenir le débit stable. Deux modes de fonctionnement existent :

-Mode isocratique : pour lequel la phase mobile est fixe (elle peut être composé d'un seul produit ou d'un mélange préalablement effectué manuellement) tout au long de l'analyse.

-Mode gradient : pour lequel on fait varier la composition de la phase mobile en cours d'analyse, nécessitant des pompes spéciales qui permettent de faire cette variation.

- **Injecteur :**

L'injection d'un volume précis de l'échantillon en tête de la colonne doit se faire en temps bref pour éviter toute perturbation du régime de circulation de la phase mobile. On utilise pour ce faire, une vanne à plusieurs voies, manuelle ou automatisée.

- **La Colonne et phase stationnaire:**

Considérée comme le cœur du système, la colonne est un tube calibré, en acier inoxydable ou en verre garni de la phase stationnaire.

- **Détecteur**

C'est l'une des parties essentielles de l'appareil puisqu'elle permet d'identifier et de suivre l'élution et la séparation des solutés et de mesurer leur concentration.

Le but du détecteur est de fournir un signal électrique qui doit refléter en continu les variations de composition de l'éluant en sortie de colonne et permettre ainsi de détecter le passage successif des différents composés. Le détecteur doit fournir une réponse proportionnelle à la concentration instantanée d'un même composé. Actuellement il existe plusieurs types de détecteur qui peuvent être associés au système HPLC (spectrométrie de masse, spectre fluorimétrique ...). Le détecteur le plus couramment utilisé reste le détecteur spectrophotométrique UV-Visible. Ce détecteur (UV-Visible) peut avoir une détection monochromatique (une seule longueur d'onde, c'est le modèle de base) ou polychromatique, Cette dernière détection, permet soit de faire varier les longueurs d'onde au cours de l'analyse, soit d'enregistrer le signal à plusieurs longueurs d'onde simultanément, c'est le cas du détecteur à barrette de diodes que nous avons utilisé.

➤ **Système d'enregistrement et de détection :**

Il s'agit d'un ordinateur qui récupère les données issues du détecteur, trace les chromatogrammes, et intègre la surface des pics.

II.3.1.b. Analyse par chromatographie gazeuse :

❖ Principe

La chromatographie en phase gazeuse CPG est une méthode séparative parmi les plus employées dans les laboratoires d'analyse, elle permet de séparer les composés thermostables et relativement volatiles. L'échantillon est injectée au niveau de l'injecteur puis évaporé et transporté le long de la colonne dans des conditions analytiques adéquates, chaque molécule parcourt la colonne avec un temps qui lui est propre et génère un signal au niveau du détecteur qui est enregistré et traité par des moyens informatiques.

❖ Les différents composants de la chromatographie gazeuse (GC):

Un appareil de chromatographie en phase gazeuse comporte généralement trois parties : Injecteur, une colonne capillaire, et un détecteur [56]. La *Figure II.3.b* représente les différents compartiments d'un appareil chromatographie gazeuse.

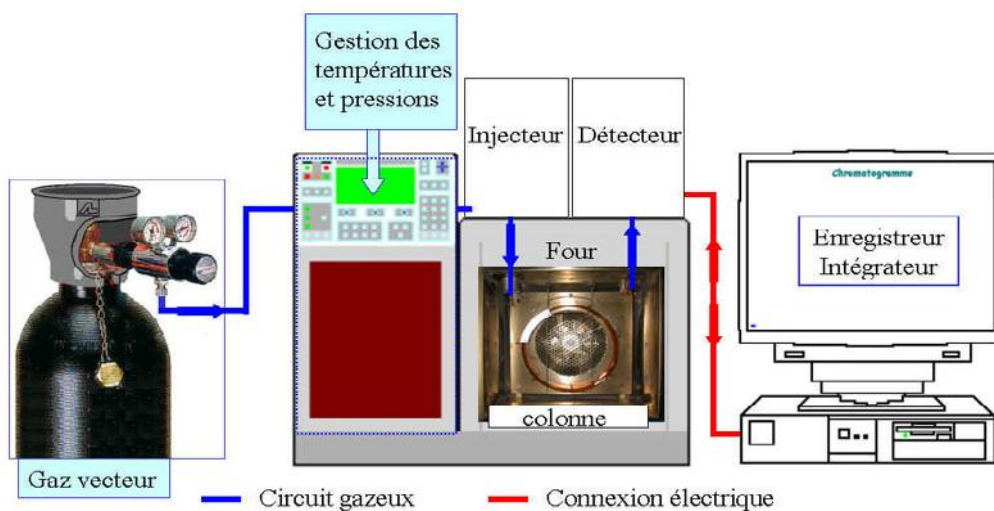


Figure II.6: Schéma des composants d'un appareil GC.

Un appareil de chromatographie gazeuse (GC) est généralement composé de plusieurs compartiments :

➤ L'injecteur

L'injecteur est une zone chauffée où l'échantillon est introduit en solution au moyen d'une micro-seringue puis vaporisé et mélangé au gaz vecteur, le gaz vecteur généralement de l'Azote (N_2) ou de l'Hélium (He) constitue la phase dite mobile. Son rôle est de transporter les analytes depuis l'injecteur via la colonne. Il existe deux types d'injecteurs.

Mode *split* (avec diviseur) : dans ce cas, le gaz vecteur qui entraîne l'échantillon de la chambre d'injection vers la colonne est divisé en deux flux dont l'un traverse la colonne et l'autre s'échappe par un système de fuite: le rapport du diviseur peut être réglé à volonté .ce mode s'applique généralement pour l'injection à volume inférieure au microlitre.

Mode *splitless* (sans diviseur) : ce procédé permet la concentration des solutés très dilués. La solution injectée est volatilisée puis entraînée dans la première spire de la colonne capillaire où elle se condense à une température inférieure au point d'ébullition de 20 à 30 degrés du solvant afin de condenser ce dernier et piéger les molécules. L'injecteur est ensuite balayé par le gaz vecteur qui élimine l'excès de solvant. L'élévation progressive de la température du four provoque la volatilisation des substances condensées qui sont ensuite chromatographiées.

➤ **Le four et la colonne capillaire:**

Le four contient l'élément clé de la séparation chromatographique. La colonne capillaire qui est constituée d'un tube de silice fondue dont la paroi interne est couverte d'un film chimique nommé « phase stationnaire » elle est caractérisée par des fonctions chimiques greffées sur la silice. Si ces dernières sont peu polaires (chaîne alcanes ou groupements phényles, par exemple), la colonne est dite "*peu polaire*". Si, au contraire, la phase stationnaire est constituée de composés polaires tels que, par exemple, des polyéthylènes glycols, la colonne est dite "*polaire*". Les constituants d'un mélange sont séparés en fonction de leur polarité si la phase stationnaire est polaire, de leur volatilité si cette dernière est apolaire ; leurs différences de propriétés Physicochimiques leur confèrent des vitesses d'élution différentes et ils sont donc séparés en fonction du temps.

➤ **Détecteur :**

Le détecteur en chromatographie gazeuse est situé dans un compartiment immédiat à la sortie de la colonne il permet de détecter les analytes dès leurs sorties de la colonne.

Actuellement, il existe un très grand nombre de détecteurs qui peuvent être couplés à la chromatographie gazeuse à s'avoir (FID, ECD, NPD, TCD, SM.)

II.4. Notion fondamentale de chromatographie :

Quelque soit la méthode chromatographique, elle est régie par des grandeurs fondamentales, les plus importantes sont rappelées ci-dessous [57,58] :

a- grandeurs de rétention :

- Temps mort (t_m) : c'est le temps de rétention d'un composé non retenu par la colonne.
- Temps de rétention réduit ou corrigé (t_R') : c'est le temps qui sépare les deux sommets du pic soluté à analyser et celui non retenu par la colonne (pics du solvant) correspondant au temps mort, il est susceptible de varier en fonction du débit, de la composition de la phase mobile, de la température et de la nature de la phase mobile.

$$t_R' = t_R - t_m$$

(3)

- Le facteur de capacité (K') : c'est le rapport entre le temps de rétention réduit et le temps mort, il est indépendant du débit.

$$K' = t_R / t_m \quad (4)$$

b- paramètre lié à l'efficacité :

L'efficacité d'une colonne chromatographique, dont dépend l'étalement des pics, est mesurée pour chaque composé, par le nombre de plateaux théoriques N correspondant à la colonne.

Plus le N est grand plus le pouvoir de séparation de la colonne est grand.

$$N = 16(t_R / w)^2 \quad (5)$$

t_R : c'est le temps de rétention d'un composé.

w : largeur du pic à la base.

c -le facteur de séparation :

Pour caractériser la distance séparant les sommets de deux pics adjacents, on utilise la sélectivité.

$$= t_{R1}' / t_{R2}' = K_1' / K_2' \quad (6)$$

d-Le facteur de résolution :

Une bonne résolution est représentée par un retour à la ligne de base du premier pic avant que le second démarre.

$$R = 2(t_{R1} - t_{R2}) / (W_1 + W_2) \quad (7)$$

Chapitre III :

Analyse des pesticides par HPLC

A decorative graphic consisting of a horizontal line and a vertical line intersecting at the left end. The horizontal line is dark grey and the vertical line is light grey.

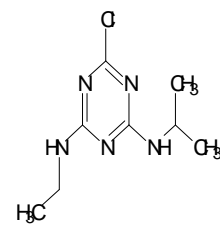
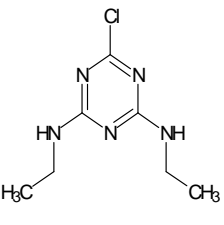
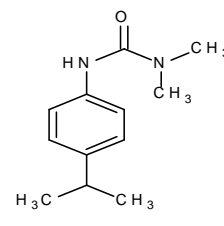
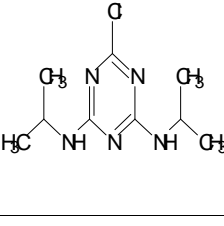
III.1.Choix des pesticides utilisés:

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux herbicides organiques en regard de l'importance de leur utilisation dans les zones agricoles. Différentes familles chimiques composent cette classe de produits phytosanitaires, nous nous sommes limités à cinq herbicides appartenant à deux familles chimiques (*Triazine* et *Urée substituée*) ainsi qu'à certains de leurs produits de dégradation. Les structures et les propriétés physico-chimiques relatives aux pesticides choisis pour cette étude sont présentées dans le *Tableau. III.1*.

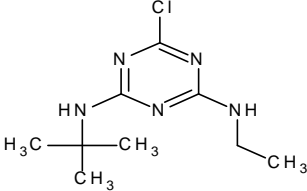
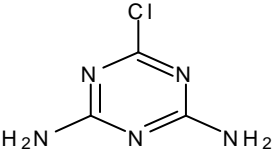
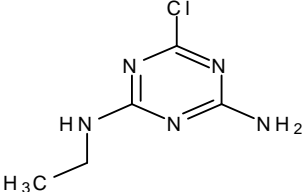
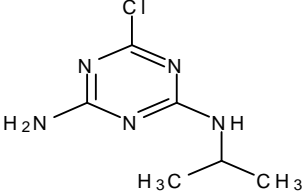
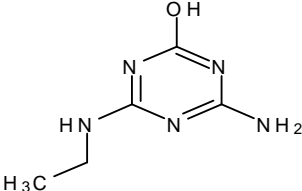
La *Figure III.1* représente les principales transformations des triazines dans l'eau et dans le sol. L'Atrazine-Desethyl (**DEA**) est présentée par de nombreux auteurs comme le principal produit de dégradation formé avec les différentes triazine [59,60], cette dernière est en effet plus stable que l'Atrazine Desisopropyl (**DIA**) qui se transforme rapidement en Atrazine Deethyl disopropyl (**DDA**) et en Hydroxy-deethylatrazine (**DIHA**) comme le montre la *Figure III.1*.

La solubilité en milieu neutre des pesticides étudiés présente des valeurs comprises entre 6 mg/L pour la Simazine et 70 mg /L pour l'Isoproturon ; des différentes significations peuvent donc être utiles en terme de mobilité pour les divers molécules dans l'eau et dans le sol. Ajoutant également que les triazine sont des molécules ionisables, et les valeurs de pKa montrent que dans les conditions du milieu naturel (pH voisin de 7), les molécules seront sous forme ionisée à l'inverse des urées substituées (Isoproturon).

Tableau III.1 : Propriétés physico-chimiques des pesticides et des produits de dégradation sélectionnés [61,62].

Nom	Formule	Structure	LogKow	pka	S (mg/L)		Mode d'Action
					Dans l'eau	Dans le méthanol	
Atrazine	$C_8H_{14}ClN_5$		2,61	1,7	28	18000	Inhibiteur de la photosynthèse, efficace contre les germinées des cultures de maïs, les mauvaises herbes.
Simazine	$C_7H_{12}ClN_5$		2,18	1,62	6,2	400	Inhibiteur de la photosynthèse efficace contre les germinées des cultures.
Isoproturon	$C_{12}H_{18}N_2O$		2,87	-	70	-	Inhibiteur de la photosynthèse, utilisée sur les cultures de blé tendre.
Propazine	$C_9H_{16}ClN_5$		2,93	1,7	8,6	56000	Herbicide très efficace contre les germinées utilisé également comme désherbant.

Chapitre III. Analyse des pesticides par HPLC

Terbutylazine	$C_9H_{16}ClN_5$		3,21	1,9	8,5	-	Herbicide, Microbicide, utilisé pour le désherbage de la vigne, pomme.
Atrazine Deethyl disopropyl (DDA)	$C_3H_4ClN_5$		0,35	-	-	-	Métabolite
Atrazine Desisopropyl (DIA)	$C_5H_8ClN_5$		1,15	1,58	-	-	Métabolite
Atrazine- Desethyl (DEA)	$C_6H_{10}ClN_5$		1,51	1,65	3,2	-	Métabolite
Atrazine Desisopropyl- 2-Hydroxy (OHDIA)	$C_5H_9N_5O$		0,42	-	-	-	Métabolite

Chapitre III. Analyse des pesticides par HPLC

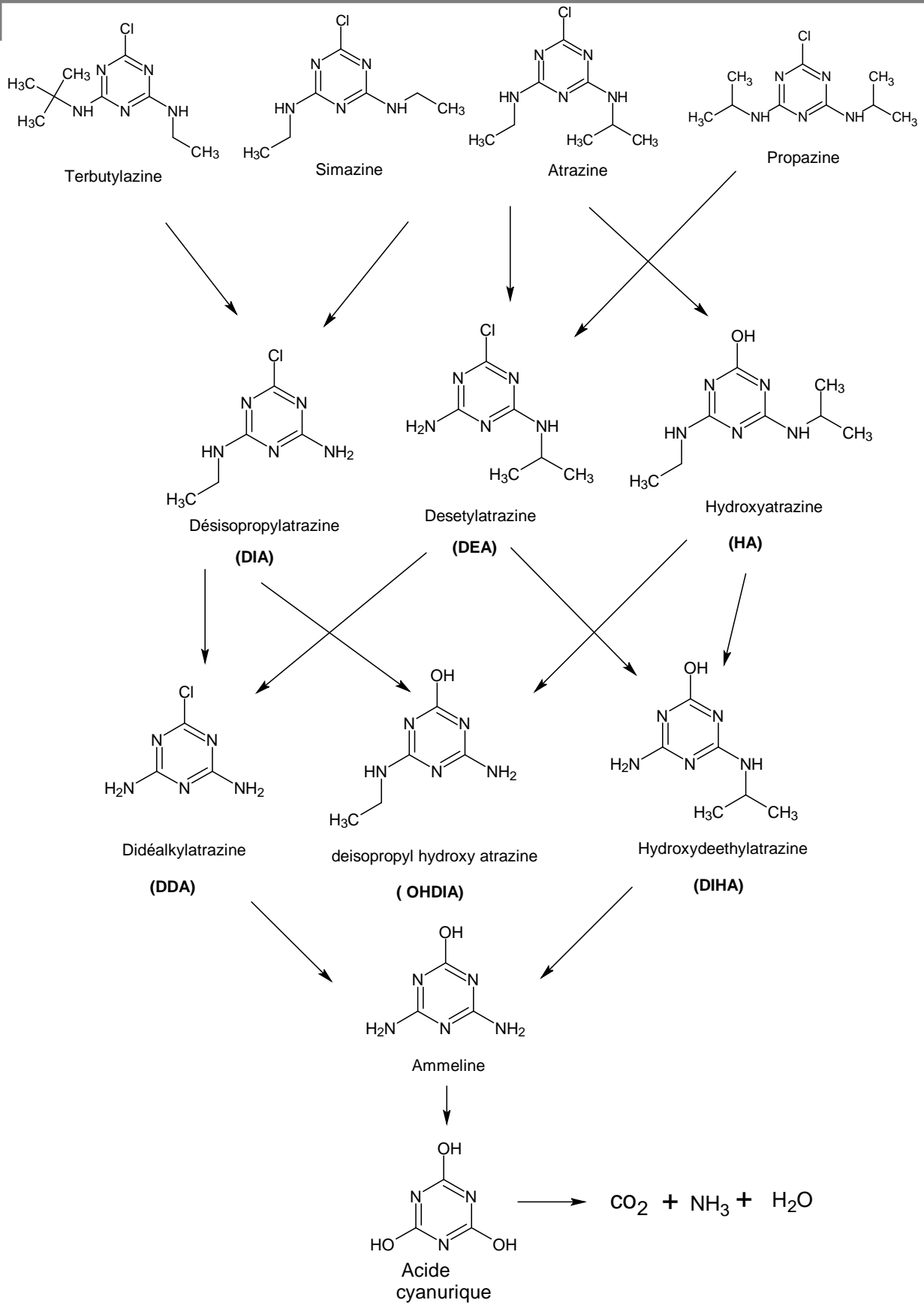


Figure III.1: Dégradation de l'Atrazine, Simazine, Propazine et de la Terbutylazine dans le sol et l'eau [7,63, 64].

III.2. Mise au point de la séparation par HPLC:

La chromatographie en phase liquide est une technique qui nous a paru intéressante à approfondir pour doser ces matières actives qui restent difficiles à analyser. Nous avons vu en bibliographie [5,64-66] que l'HPLC à polarité de phase inversée reste de loin la méthode séparative la plus utilisée pour l'analyse des pesticides et leurs métabolites dans les eaux environnementales. Couplée à un détecteur DAD, cette technique offre la possibilité d'identifier et de quantifier les molécules par comparaison avec une solution étalon de composition connue, sur la base de temps de rétention et à partir des spectres UV. D'autre part, la réussite des séparations en HPLC repose essentiellement sur le bon choix du couple phase mobile / phase stationnaire, le choix de la phase stationnaire dépend surtout de la polarité des échantillons à analyser. Quant aux choix de la phase mobile, il est souvent difficile et nécessite ainsi une optimisation préalable. Le *Tableau III.2* regroupe quelques travaux antérieurs relatifs à l'analyse de ces produits dans l'environnement.

Dans cette partie, nous allons étudier l'influence de la nature et de la composition de la phase mobile sur la séparation d'un mélange d'herbicides et des produits de dégradation. Dans le but de confronter nos résultats avec ceux des données bibliographiques existants.

Ainsi, les meilleures conditions de séparations seront retenues pour la recherche de ces xénobiotiques dans des échantillons d'eau prélevés près de zones agricoles.

Tableau III.2 .Méthodes d'analyse des pesticides par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

pesticides étudiées	Condition Opératoire	Application	Réf
Terbutylazine et ses métabolites	Colonne C8 (250mm, 4.5mm,5µm) ACN-tampon acétate d'ammonium 0.01M (Gradient d'élution) Débit =1ml min ⁻¹ , λ=220,230 nm.	Analyse des triazines dans l'eau	[65]
Atrazine Simazine Propazine	Colonne C18 (200 mmx4, mm ,5µm) ACN/Eau (70/30, V/V) Débit =1ml min. ⁻¹ , λ=220 nm.	Optimisation de la méthode	[66]
Atrazine Simazine	colonne C18 (150mm, 4.5mm, 5µm) ACN/Eau (85/15, V/V) Débit 1ml min ⁻¹ , λ=220 nm.	Analyse des triazines dans l'eau	[67]
Isoproturon et ses métabolites	Colonne C18 (250mm, 2mm, 5µm) ACN/Eau (25/75, V /V) Débit = 0.7ml min ⁻¹ . , λ=200 nm.	Eau souterraine	[5]

III.3.Protocole Expérimental

❖ Produits et réactifs :

Atrazine, Simazine, Terbutylazine, Atrazine déséthyl désisopropyl, Atrazine désisopropyl-2-Hydroxy, Atrazine désisopropyl, Atrazine déséthyl ,propazine, de purté > 98 % ont été obtenu de la firme *Sigma-Aldrich* et l'Isoproturon chez *Eherbstorfer*.

❖ **Les solvants** : le Méthanol et l'Acétonitrile utilisés sont de grade HPLC (*Sigma-Aldrich*).

❖ Appareillage :

L'identification des pesticides a été déterminée à l'aide d'un appareil HPLC de type Perkin Elmer serie 200 muni d'un détecteur DAD (Diode array detection) et d'une boucle d'injection d'un volume d'échantillon de 20µl, la séparation a été réalisée sur une colonne supelco-C18, de longueur 25cm, de diamètre interne 4,6 mm, remplis avec une phase en silices greffées C18. Une longueur d'onde de 220nm (la longueur d'onde maximale pour l'ensemble de ces molécules), les spectres UV ainsi obtenus des molécules étudiées sont représentés en annexe 1. Les chromatogrammes sont enregistrés sur un ordinateur en utilisant le logiciel : total chrom (Perkin Elmer). Les mesures du pH ont été réalisées avec un pH-mètre (MeterCG825).

II.3.1.Préparation de la phase mobile :

Les solvants utilisés sont dégazés et filtrés au préalable. Aussi ils doivent être inertes à l'égard des substances à séparer et capables de dissoudre la totalité des composés présents dans le mélange à analyser. En plus, ils ne doivent pas absorber dans la même région que les substances recherchées. La phase mobile de nature hydro-organique est un mélange binaire Eau/Méthanol ou Acétonitrile comme modificateur organique [65-67]. Nous avons recherché une composition de la phase mobile qui permet une résolution optimale des *Herbicides* et des produits de dégradation étudiés d'abord en mode isocratique pour des raisons de simplicité d'application. Ainsi, nous avons fait appel à un mélange binaire (Eau acidifiée à pH=4.6/MeOH). Puis nous avons procédé au gradient d'élution ci-dessous pour la *phase A* : Tampon phosphate pH=4.6/MeOH et la *phase B* : Eau/ACN.

T (min)	débit (ml/min)	Tampon phosphate	Solvant organique%	Palier
0.5	0.4	80	20	-
50	0.4	30	70	4
60	0.4	30	70	-

Le gradient suit une variation de profil 4. Les différentes programmations pouvant existées en mode gradient sont représentées dans la *Figure III.2*.

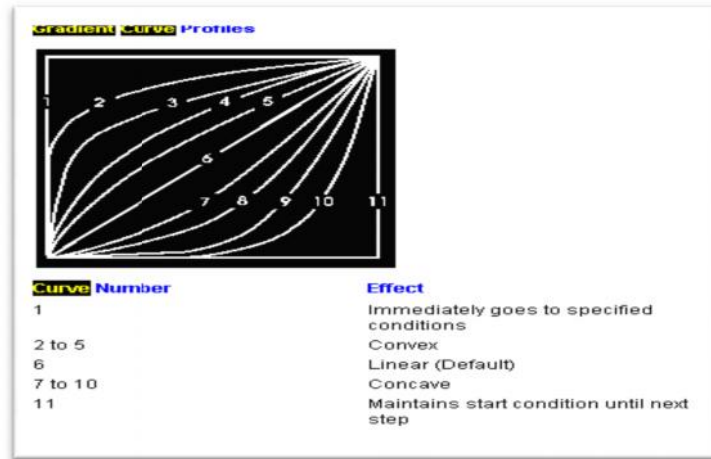


Figure III.2 : Différents profils de gradient HPLC avec l'élévation de la teneur en eau.

III.3.2. Préparation des solutions :

Des solutions de chaque pesticide ont été préparées respectivement dans le méthanol et l'Acetonitrile, puis injectées dans la phase mobile A (MeOH/Tampon) en mode isocratique avec une composition respective de (70/30, V/V), (60/40, V/V), (40/60, V/V), (20/80, V/V), et dans les deux phases mobiles A, B en mode gradient.

III.3.3. Préparation des échantillons d'eaux :

a) Echantillonnage :

La stratégie d'échantillonnage adoptée dans le cadre de ce travail est fondée sur la couverture spatiale d'un ensemble du système agricole. Six sites de prélèvement ont été sélectionnés dont cinq zones situées dans le coté de la Mitidja à savoir : Ain-Taya, El-Kaddous, Boufarik, Benchâbane et Birtouta, ainsi qu'une eau prélevée à l'entrée de la station d'épuration de Boudouaou.

Les échantillons d'eau de drainage et celle issue de la station d'épuration sont collectés dans des bouteilles de verre préalablement lavées et décontaminées puis conservés dans de glace pendant leur transport et ensuite conservés à 4°C jusqu'à leurs analyses.

B) Extraction :

Quand l'analyse porte sur des échantillons d'eaux le pesticide est entraîné par partage entre l'échantillon aqueux et un solvant non miscible à l'eau tel que le dichlorométhane ou l'hexane [29-32]. Selon la solubilité du pesticide dans ces derniers, les deux phases sont séparées par décantation, puis la phase organique est récupérée et séchée au sulfate de sodium anhydre. Après filtration et concentration l'extrait est dosé par chromatographie. Dans ce travail nous avons retenu le dichlorométhane comme solvant d'extraction. Ainsi, un volume de 1L de chaque échantillon d'eau est extrait 3 fois par 100 ml de dichlorométhane. Après extraction, la phase organique est récupérée puis séchée avec le sulfate de sodium, le solvant est par la suite évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif jusqu'à un volume d'environ 1 ml puis concentré à sec sous courant d'Azote. L'échantillon est ensuite repris dans 1 ml d'ACN avant l'analyse chromatographique.

III.4. Résultats et discussions :

Le *Tableau III.3* donne l'ordre d'élution des pesticides étudiés et certains de leurs produits de dégradation en fonction de la proportion et de la nature de la phase mobile :

Tableau III.3. Ordre d'élution des pesticides dans les différentes phases.

Composition de la phase Mobile	Phase A (70/30, V/V)	Phase A (60/40, V/V)	Phase A (40/60, V/V)	Phase A (20/80, V/V)	Phase A Gradient	Phase B Gradient
Atrazine	5	5	5	7	6	6
Simazine	7	6	6	5	5	5
Isoproturon	6	7	7	6	7	7
Propazine	9	8	8	8	8	8
Terbutylazine	8	9	9	-	9	9
Atrazine-désétyl-désisopropyl	1	2	2	3	2	1
Atrazine désisopropyl	3	3	3	4	3	3
Atrazine déséthyl	4	4	4	1	4	4
Atrazine désisopropyl 2-hydroxy	2	1	1	2	1	2

Phase A: MeOH/tampon, Phase B: ACN/Eau

Il existe une corrélation importante entre la polarité de la molécule et l'ordre d'élution. En effet, dans le cas de la chromatographie liquide en mode inverse, l'ordre d'élution des composés est inversement proportionnelle à leurs polarités ; plus le produit est polaire moins il aura d'interaction avec la phase stationnaire et donc il sera élué plus rapidement. D'autre part, la solubilité du produit dans la phase mobile est un facteur tout aussi important du fait que les composés n'ont pas la même solubilité, ils seront donc entraînés à des vitesses d'élution différentes.

Nous remarquons, à travers ces résultats, que pour la phase mobile A (mode isocratique), les produits de dégradation des triazines, qui possèdent les structures chimiques les moins encombrés et les plus polaires, sortent en premiers, ils seront moins retenus par la phase stationnaire qui est apolaire. Parmi ces produits, l'atrazine désalkylée (DDA) sort en premier, suivie de l'atrazine desisopropyl et puis l'atrazine désisopropyl-2-hydroxy. Ceci peut être expliqué par le fait que le chlore exerce un effet inductif attracteur (I) plus grand que celui de l'Hydroxy. On aura donc une augmentation de la densité de charge dans le cycle triazine, en particulier pour les atomes d'azote en position 1,3 ce qui conduit à une polarité plus élevée et donc à une affinité plus faible avec la phase stationnaire C18. Ainsi, le Chloro-triazine aura un temps de rétention plus faible que l'Hydroxy-triazine [68]. (*Figure III.3*)

Concernant les trois chloro-triazine à savoir l'Atrazine, Simazine et la Propazine l'ordre d'élution augmente dans le sens de l'allongement de la chaîne alkyl des groupements amines. Plus la chaîne s'allonge plus la molécule est apolaire, elle sera donc plus retenue par la phase stationnaire, son temps de rétention sera par conséquent plus important (*Figure III.4*). Nous constatons aussi une inversion de l'ordre d'élution entre certains composés en comparant à titre d'exemple le chromatogramme présenté respectivement dans les *Figures III.4 et III.5*, si on prend le cas l'Atrazine et la Simazine ; ces deux molécules possèdent des polarités proches mais des solubilités très différentes (l'Atrazine est 40 fois plus soluble dans le méthanol que la Simazine). Cette augmentation de solubilité va entraîner une inversion d'ordre entre les deux molécules en passant d'une proportion d'eau de 30% vers 80% (*Tableau III.3*). Quelques exemples de chromatogrammes obtenus dans ce travail sont représentés dans les figures **III.3-III.5**:

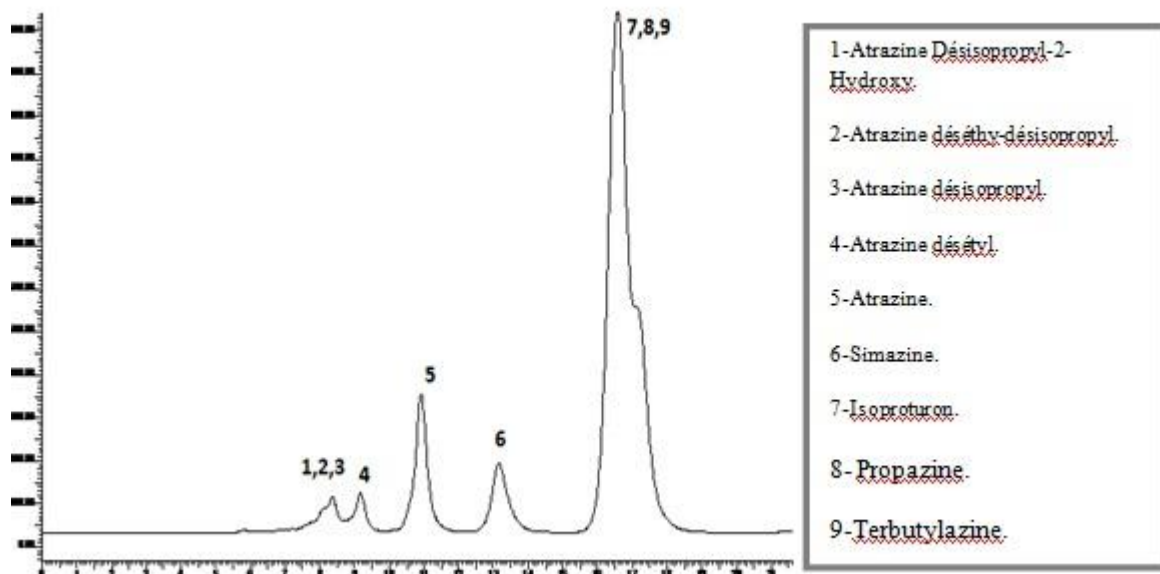


Figure III.3 : Chromatogramme obtenu en mode isocratique avec une teneur en MeOH 70 %.

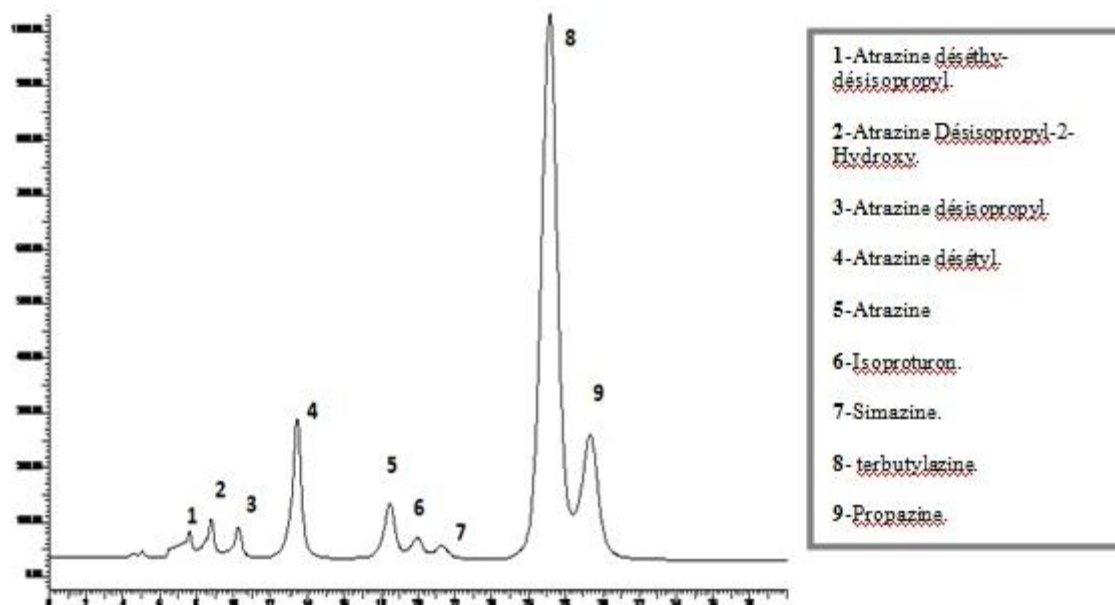


Figure III.4 : Chromatogramme obtenu en mode isocratique avec une teneur en MeOH 60%.

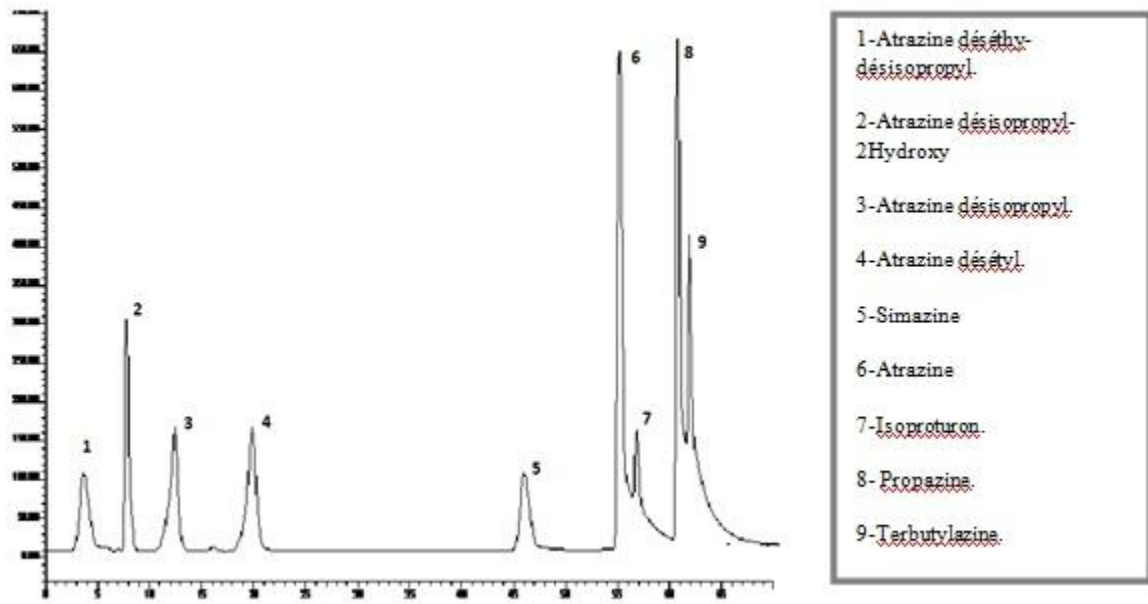


Figure III.5: Chromatogramme obtenu dans le mode gradient avec une phase mobile (Eau/ACN).

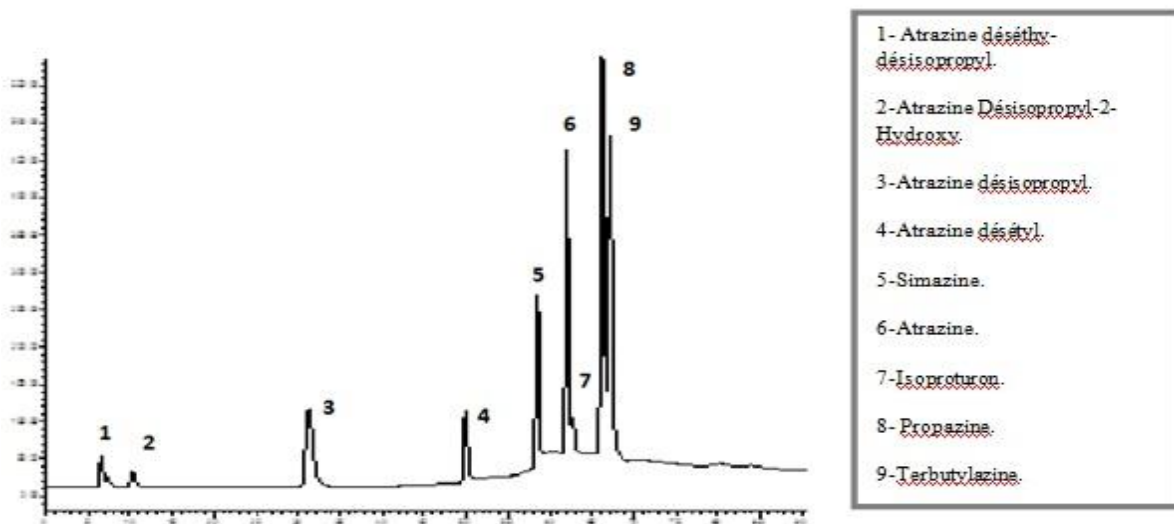


Figure III.6: Chromatogramme obtenu dans le mode gradient avec une phase mobile (Tampon/MeOH).

III.4. Étude de l'Influences de la nature et de la composition de la phase mobile sur les grandeurs chromatographiques :

a) Nombre de plateau théorique (N) :

Dans la *Figure III.7* on a la variation de l'efficacité de la colonne utilisée dans ce travail en fonction de la teneur en eau, dans les deux modes (isocratique, gradient) et pour les différents pesticides étudiés :

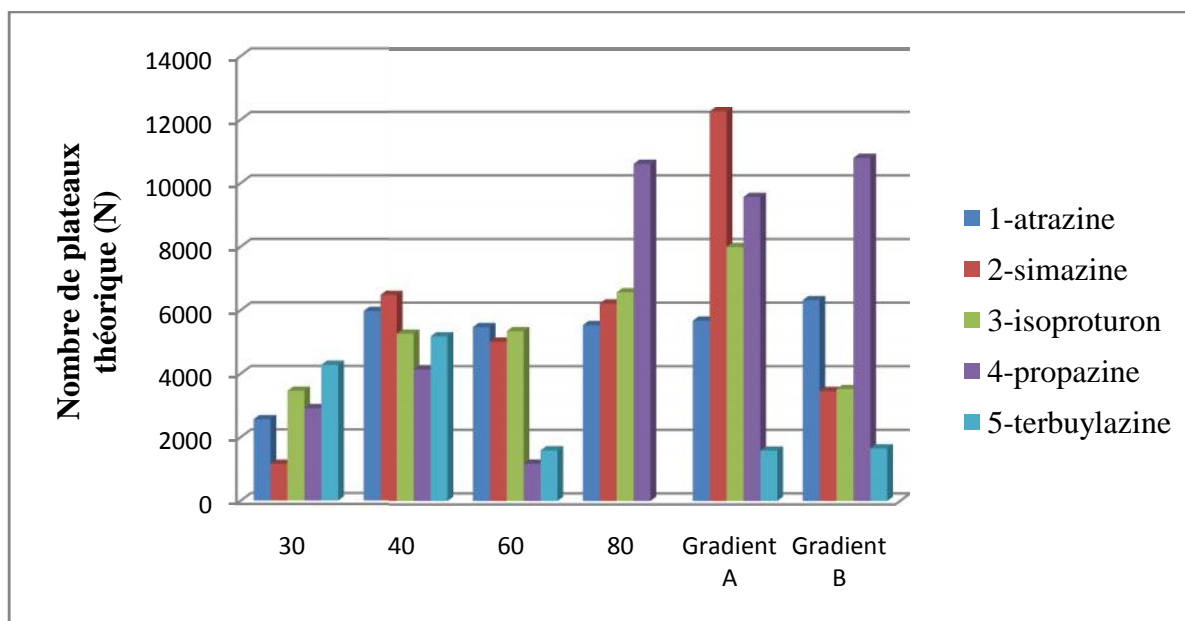


Figure III.7 : Variation du nombre de plateaux théoriques en fonction de la nature de la phase mobile pour les pesticides étudiés.

D'après cette figure nous remarquons que le nombre de plateaux théorique varie avec la composition de la phase mobile pour les quatre pesticides (Atrazine, Simazine, Isoproturon et le terbutylazine), l'efficacité de la colonne est généralement plus grande dans la phase mobile Tampon /MeOH (80/20, V/V), sauf pour le Terbutylazine qui présente une efficacité de colonne plus petite. Nous remarquons aussi que pour l'atrazine désisopropyl l'efficacité est plus grande en mode isocratique avec une teneur en Eau de 60 et 80 % (*Figure III.8*).

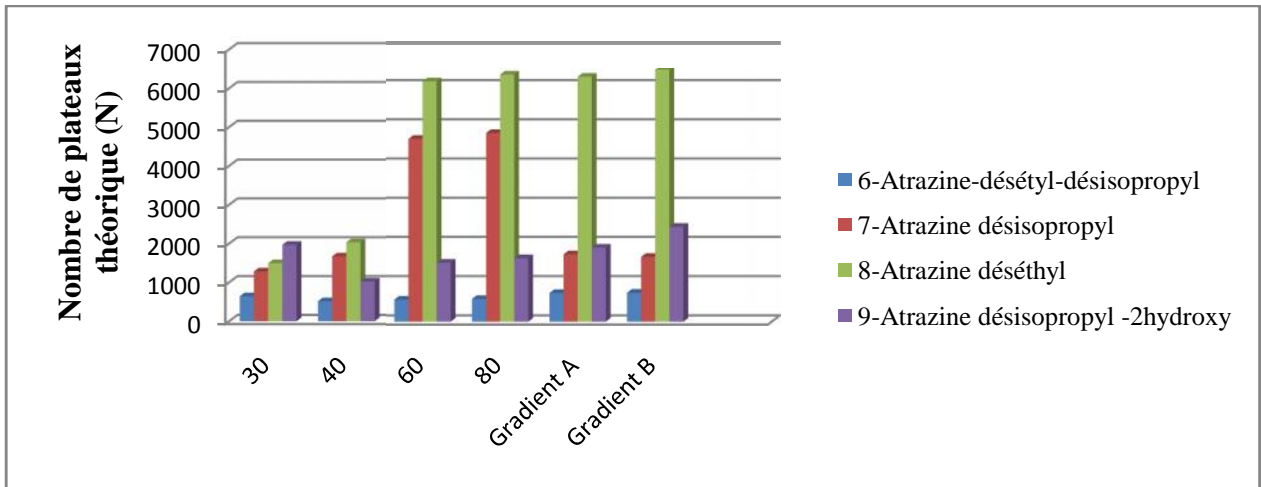


Figure III.8 : variation du nombre de plateaux théoriques en fonction de la teneur en Eau pour les produits de dégradation.

b) La sélectivité ():

La *Figure III .9* montre la variation de la sélectivité en fonction de la composition et de la nature de la phase mobile.

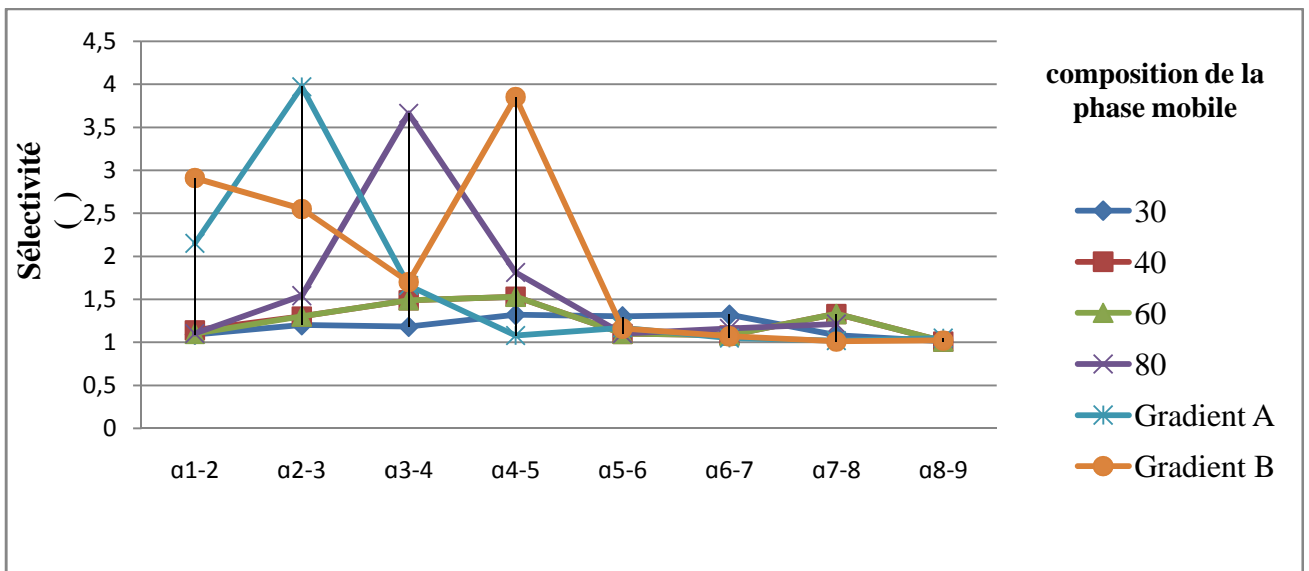


Figure III.9 : Variation de la sélectivité en fonction de la composition de la phase mobile.

D'après la **Figure III.9** nous constatons que la valeur de la sélectivité est faiblement affectée par la proportion d'eau dans la phase mobile en mode isocratique, excepté entre l'atrazine désétyl déisopropyl et l'atrazine déséthyl dans une proportion de 80% d'eau.

L'effet inverse est observé en mode gradient ; en effet, dans ce mode la composition de la phase mobile varie avec le temps ce qui va dans le même sens de la variation de la polarité, ainsi une bonne séparation est obtenue entre les différents composés.

c) la résolution (R):

La résolution est un facteur assez important en HPLC, elle renseigne sur la bonne séparation des produits dans un mélange. Le **Tableau III.4** donne la variation de la résolution en fonction de la nature et composition de la phase mobile.

Tableau.III.4 : Variation de la résolution en fonction de nature et de la composition la phase mobile.

Résolution	Phase A (70/30, v/v)	Phase A (60/40, v/v)	Phase A (40/60, v/v)	Phase A (80/20, v/v)	Phase A (Gradient)	Phase B (Gradient)
R₁₋₂	0,30	0,98	0,40	0,32	2,47	2,61
R₂₋₃	1,00	1,00	1,34	1,77	6,94	4,85
R₃₋₄	0,80	2,41	6,12	11,97	7,34	7,10
R₄₋₅	1,25	3,01	5,91	8,56	1,92	7,65
R₅₋₆	2,07	1,47	0,32	1,65	2,60	1,91
R₆₋₇	1,60	1,17	4,28	2,66	1,01	1,36
R₇₋₈	0,50	3,88	1,39	3,77	0,45	0,25
R₈₋₉	0,10	0,15	1,37	-	0,45	0,19

On constate que la résolution entre les différents composés augmente dans le sens de l'augmentation de la proportion en eau dans la phase mobile, les valeurs les plus hautes sont

obtenues respectivement en mode isocratique avec une proportion de 80% en Eau et dans le mode gradient. Une résolution est dite bonne lorsque celle –ci est supérieure à 1.5 [55].

d) Facteur de Capacité :

La variation du facteur de capacité est un paramètre fondamental caractérisant la rétention du composé dans des conditions données. Le **Tableau III.5** présente la variation du facteur de capacité (**K**) et du temps de rétention (**Tr**) en fonction de la composition de la phase mobile.

Tableau III.5. Variation du temps de rétention et du facteur de rétention en fonction de la composition et la nature de la phase mobile.

Composé	30		40		60		80		Gradient A		Gradient B	
	Tr	K	Tr	K	Tr	K	Tr	K	Tr	K	Tr	K
1	7,71	1,87	7,60	1,00	6,53	2,56	7,84	3,02	6,47	1,01	4,59	0,51
2	8,07	3,23	8,77	1,14	7,01	2,94	8,53	3,33	10,33	2,17	7,43	1,42
3	8,33	2,44	10,27	1,71	7,64	3,24	11,15	5,16	31,4	8,63	14,23	3,65
4	9,17	3,51	13,43	2,54	12,01	5,67	36,00	18,89	49,60	14,30	22,09	6,21
5	10,91	3,50	18,48	3,87	17,59	8,77	64,06	34,36	53,93	15,54	46,15	14,08
6	13,10	1,03	19,87	4,27	17,94	8,97	70,25	37,81	63,03	18,33	53,69	16,54
7	16,11	1,19	21,30	4,61	23,54	12,08	82,31	44,47	66,13	19,25	54,17	16,70
8	17,13	1,41	27,13	6,31	28,18	14,66	100,53	54,54	67,19	19,62	62,49	19,42
9	17,16	1,25	29,36	6,74	32,77	17,20	-	-	70,97	20,77	63,63	19,79

On peut relever de ce tableau, que le temps et le facteur de rétention observés sont proportionnels au pourcentage d'eau dans la phase mobile, c'est l'une des caractéristiques de la chromatographie en phase liquide en phase inverse. En effet, une augmentation dans la fraction d'eau va augmenter la polarité de la phase mobile et par conséquent le temps de rétention des composés polaire augmente.

Cependant, une bonne séparation en HPLC nécessite à la fois une bonne résolution, une grande efficacité et une bonne sélectivité avec un temps de rétention le plus court possible.

D'après les résultats obtenus dans ce travail, nous concluons que le mode gradient avec comme phase mobile Eau/ACN est le plus efficace. Les conditions d'analyse de cette phase seront retenues pour la recherche de multi-résidus des pesticides dans l'environnement.

III.5. Analyse des pesticides dans l'environnement :

a) Etalonnage :

Après avoir optimisé la phase mobile, nous nous sommes intéressés dans cette étude à la quantification de deux triazines (Atrazine et Simazine) et d'un phényl-urée (Isoproturon). Ces derniers sont susceptibles d'être contenus dans les eaux de drainage de Cinq zones agricoles (El-kaddous, Ain-Taya, Boufarik, Birtouta, Benchâbene) et les eaux de la station d'épuration de Boudouaou. Pour cela des solutions standards de concentration de l'ordre de 10 µg/l de chaque pesticide ont été préparées dans l'ACN, des dilutions ont été réalisées pour atteindre une concentration de 5, 1, 0.5 et 0.1 µg/L.

Les courbes d'étalonnages obtenues pour l'Atrazine, la Simazine, et l'Isoproturon sont représentées respectivement dans les figures III.10- III.13.

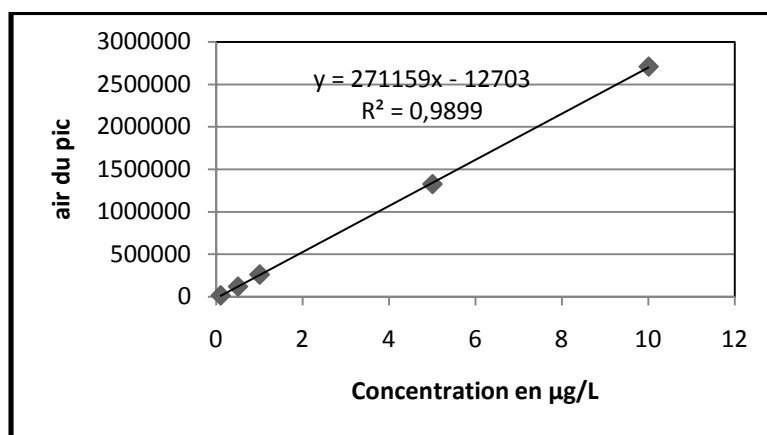


Figure III.10 : Courbe d'étalonnage de l'Atrazine.

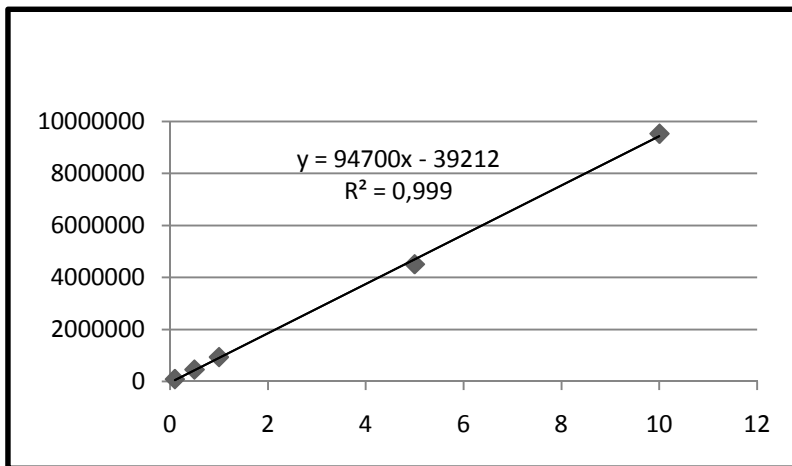


Figure III.11: Courbe d'étalonnage de la Simazine.

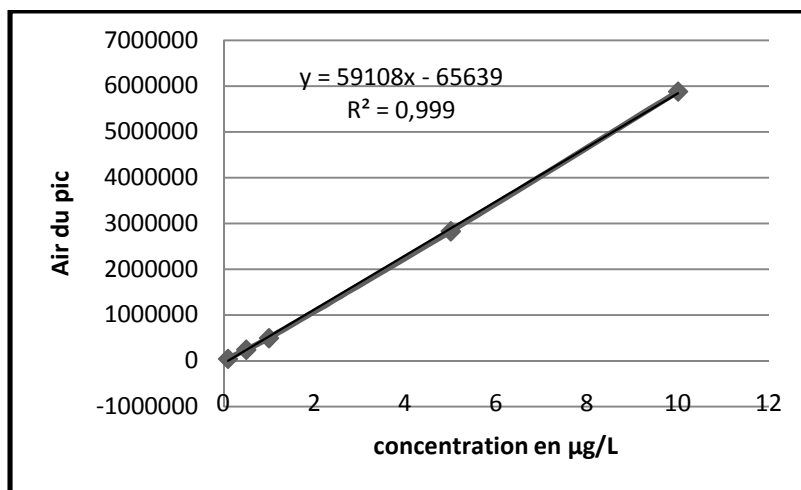
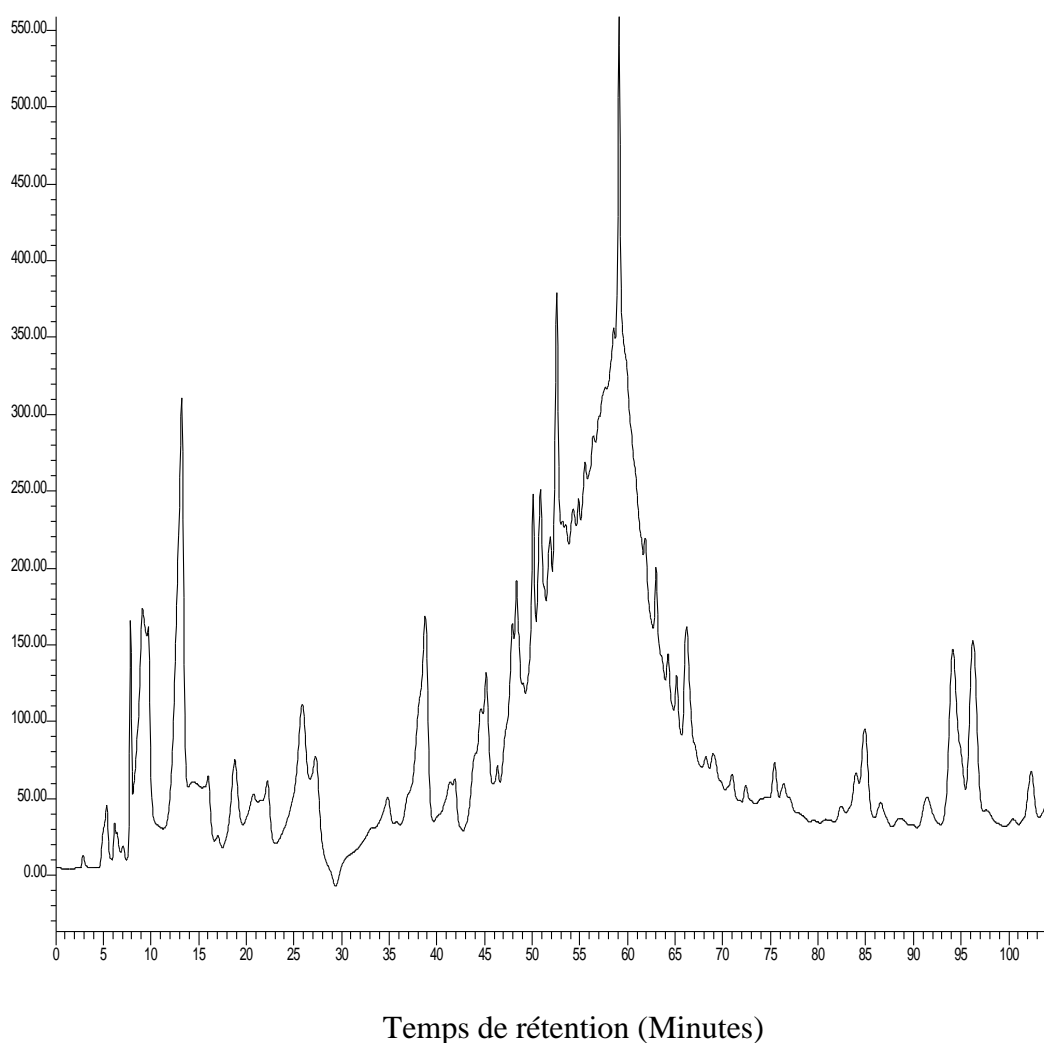


Figure III.12. Courbe d'étalonnage de l'Isoproturon.

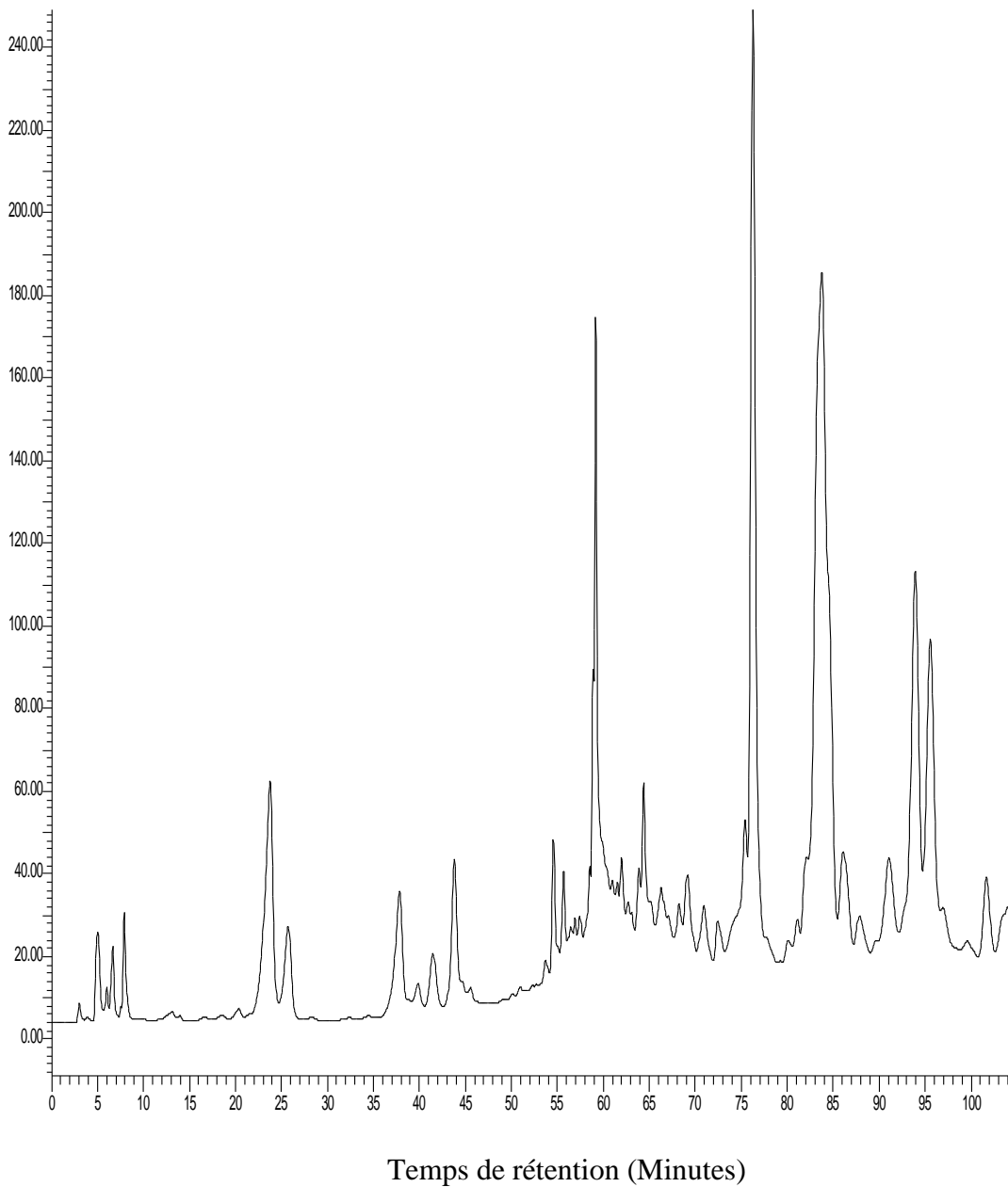
b) Analyse des échantillons d'eaux :

Les chromatogrammes obtenus lors de L'analyse des échantillons d'eaux de drainage collectés au niveau de Cinq zones agricoles et de la station d'épuration par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) sont représentés dans les figures ci-dessous :

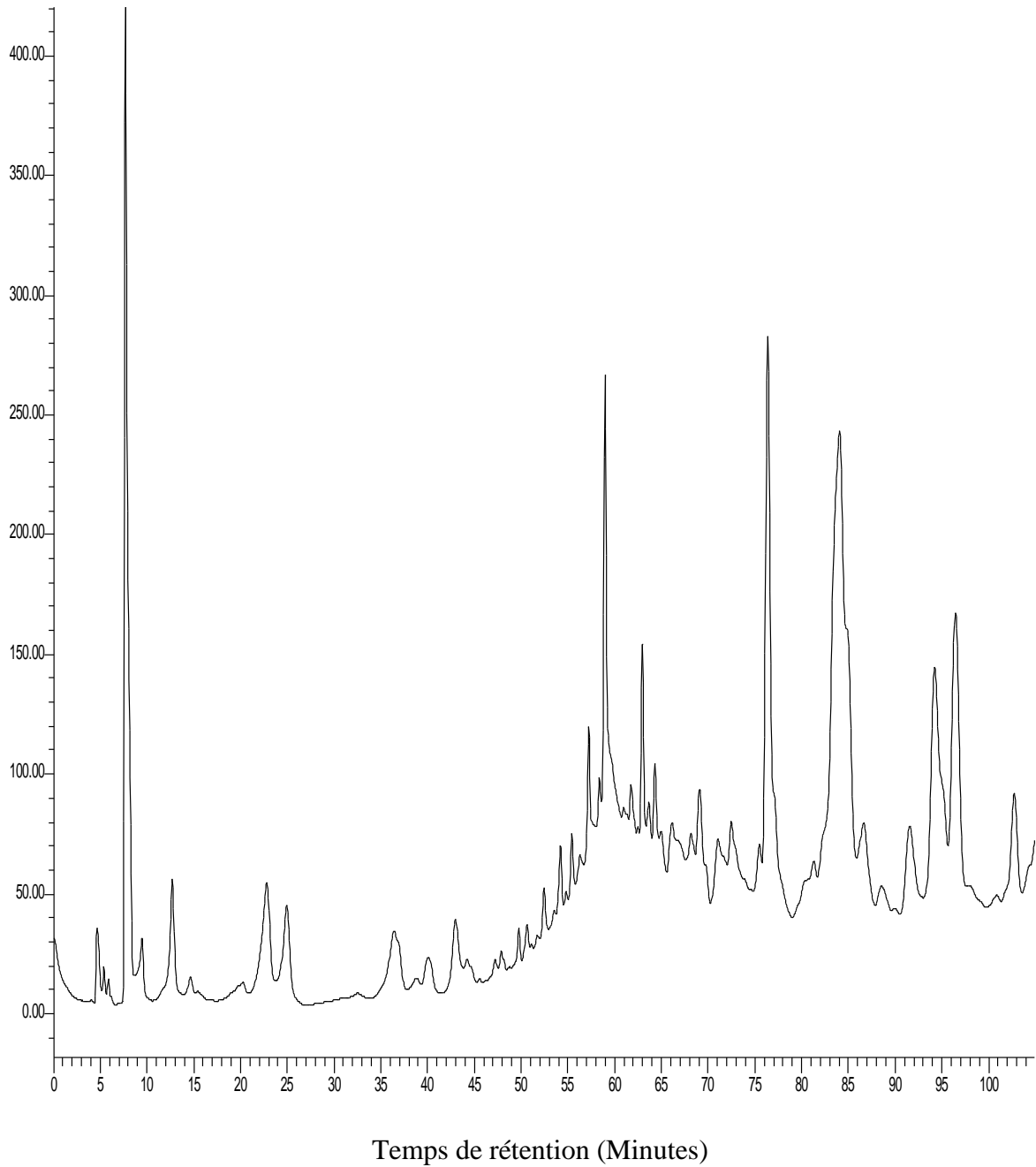
Station d'épuration de Boudouaou



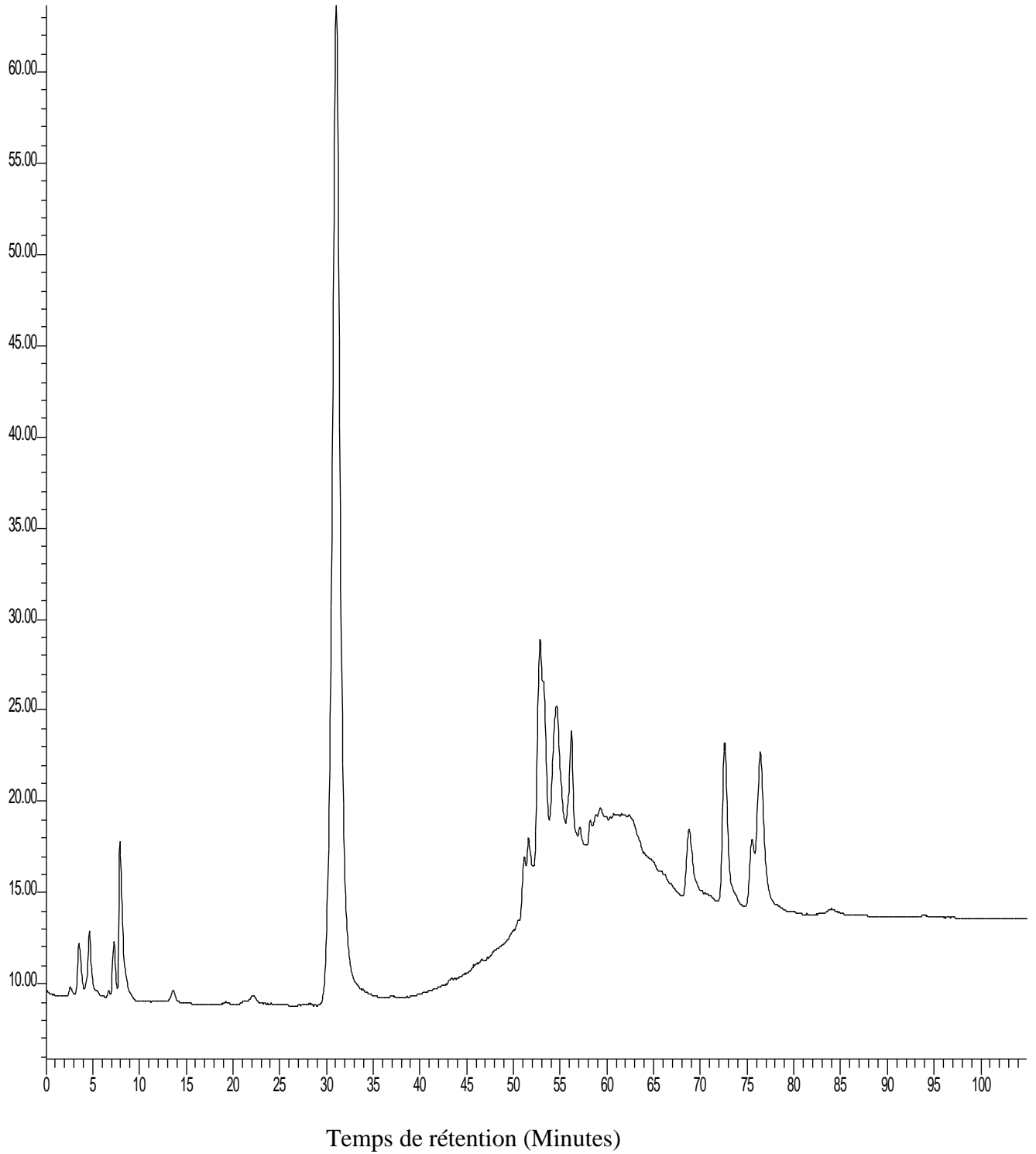
El-Kaddous



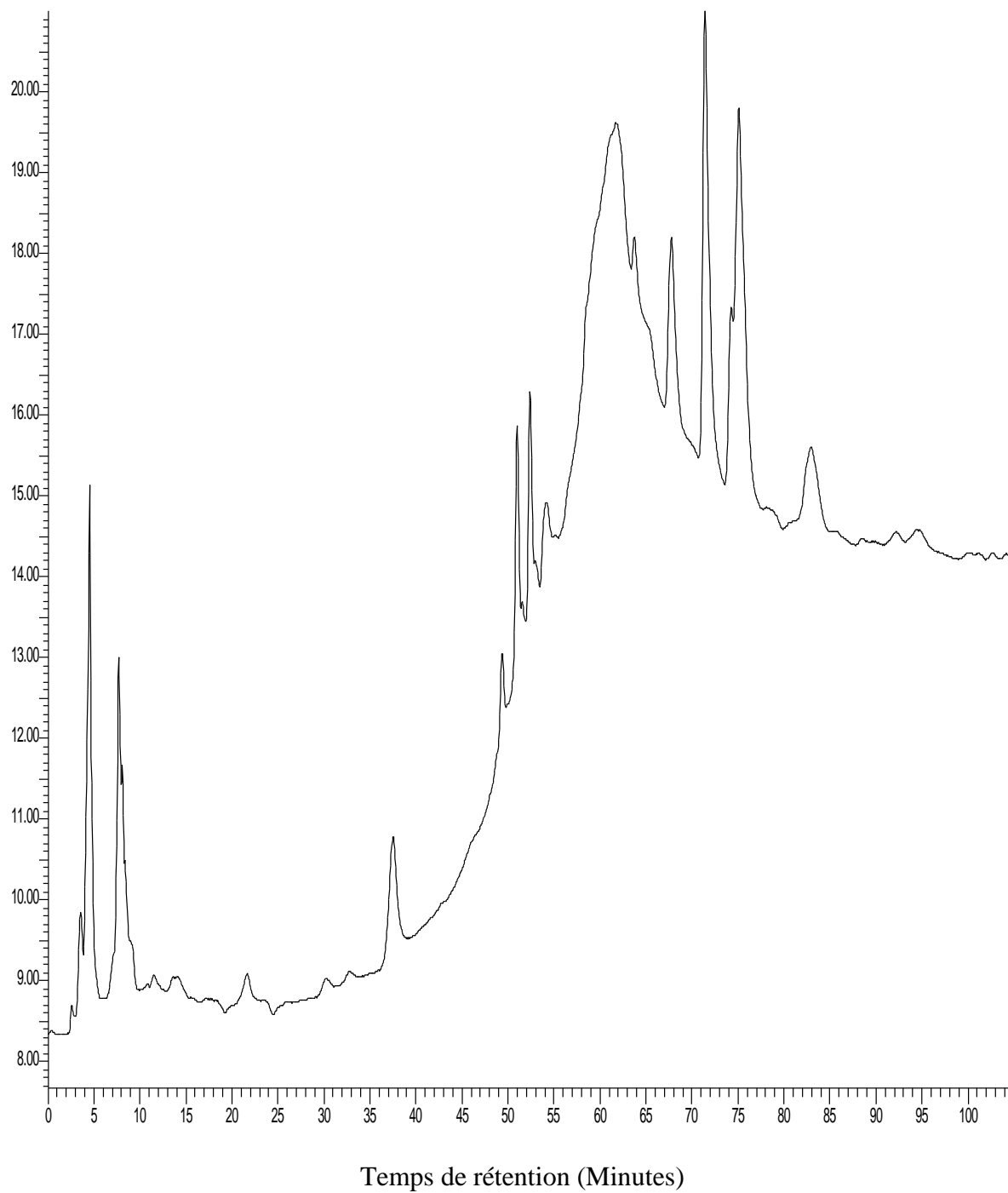
Ain-Taya



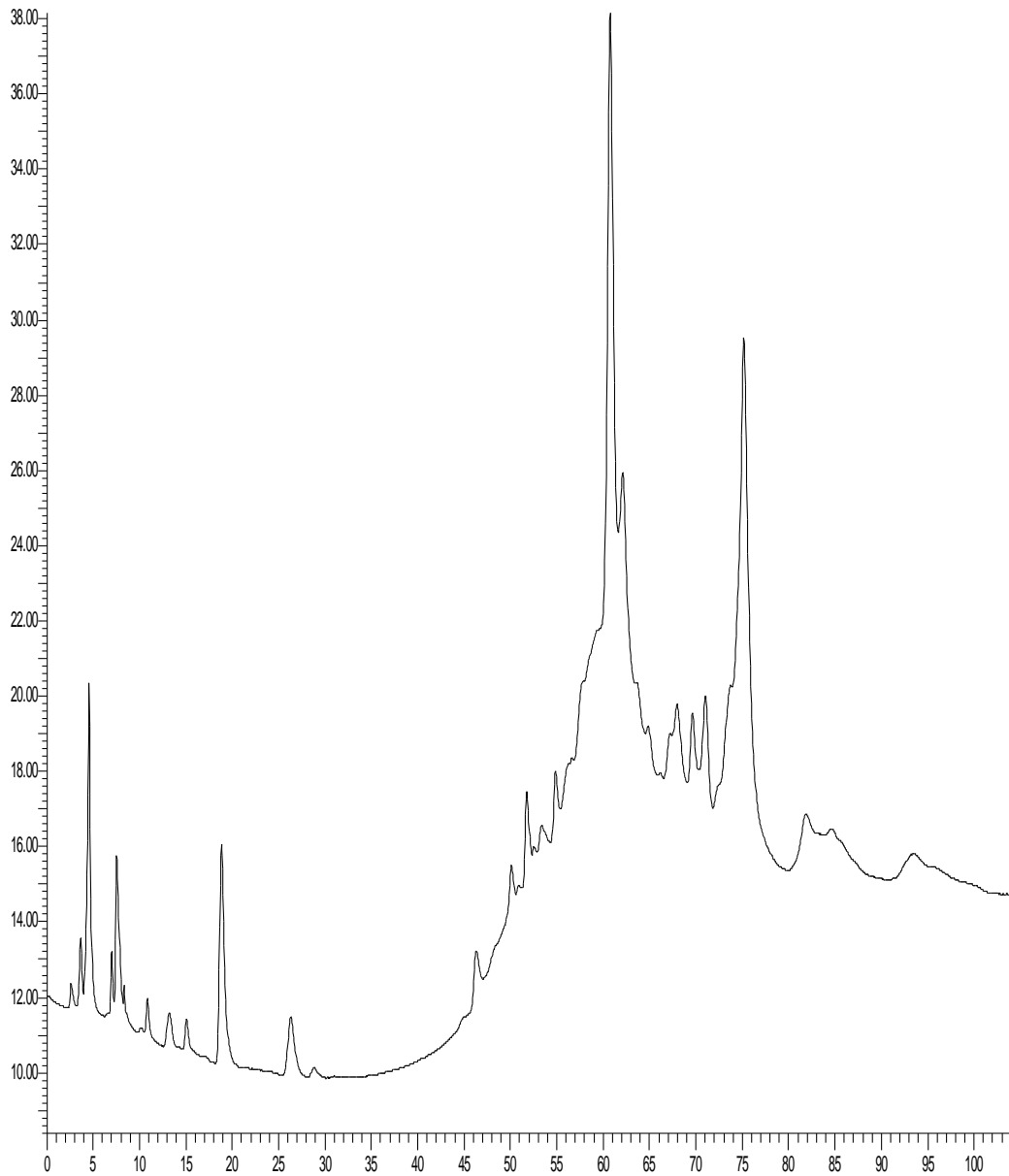
Birtouta



Bench bane



Boufarik



Temps de rétention (Minutes)

Après analyse des spectres ci-dessus (par comparaison des différents temps de rétention et confirmation avec les spectres UV des molécules étudiées avec ceux obtenus dans les différents chromatogrammes des échantillons d'eau), nous avons constaté qu'aucune trace des pesticides recherchés n'est présente dans les six échantillons d'eau qu'elle soit issue de zone agricole ou de station d'épuration. Ce résultat peut être confirmé par d'autres méthodes chromatographiques plus sensibles.

Conclusion :

Les résultats obtenus par cette technique chromatographique (HPLC), nous permettent de noter les points suivants :

- ✓ Concernant la phase A (tampon/MeOH) la composition qui sépara le mieux les neuf composés est celle avec une teneur en Methanol de 40 %. Le gradient avec un profil (4) à été choisi afin d'améliorer au mieux la séparation.
- ✓ La phase mobile qui sépare le mieux les composés étudiés est celle avec l'ACN en mode gradient.
- ✓ Les métabolites sortent en premier de chaque chromatogramme étant moins encombrés et les plus polaires ils seront moins retenus par la phase stationnaire.
- ✓ que lors de la substitution du groupement chlore par le groupement hydroxy celui-ci sera plus retenu.
- ✓ Entre les trois chloro-triazine l'ordre d'élution est dans le sens d'allongement de la chaîne carbonée. En effet, plus la chaîne s'allonge plus le composé est apolaire plus il sera retenu.
- ✓ La phase B (Eau /ACN) présente une linéarité dans le domaine de concentration de 5 µg/là 0.1µg /L. ce qui nous permet de nous situer dans les normes exigée.

L'application de cette méthode chromatographique à des échantillons d'eau issus de cinq zone agricoles ainsi qu'une eau de la station d'épuration de Boudouaou nous ont permis de constater qu'aucune trace des pesticides recherchés n'a été décelée.

Chapitre IV :

Analyse des pesticides par GC/MS

A decorative graphic consisting of a horizontal line and a vertical line intersecting at the left end. The horizontal line is dark blue and the vertical line is light blue.

Afin de vérifier la présence des résidus de l'Atrazine, de la Simazine et de l'Isoproturon dans les échantillons d'eaux issus des cinq zones agricoles: Ain-Taya, El-Kaddous, Boufarik, Benchâbane et Birtouta, ainsi qu'une eau prélevée à l'entrée de la station d'épuration de Boudouaou. Nous avons utilisé dans ce travail, une méthode d'analyse plus sensible et complémentaire qui est la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) pour l'identification des trois herbicides étudiés.

La spectroscopie de masse occupe depuis quelques années une place importante parmi les techniques les mieux adaptées à l'analyse des traces de composés organiques dans l'environnement. Utilisée à l'origine comme méthode de validation, elle devient par la suite une méthode de dosage à part entière et cela depuis l'apparition des couplages avec les méthodes chromatographique. En effet, cette méthode est bien adaptée à l'analyse des pesticides, grâce à sa capacité d'analyse qualitative et quantitative, mais aussi à la richesse des informations accessible permettant la caractérisation du composé recherché par sa masse moléculaire et sa structure [69]. Le *Tableau VI.1* regroupe quelques travaux antérieurs effectués sur les pesticides étudiés.

IV.1.Principe de la spectroscopie de masse

Un composé organique introduit dans le spectromètre de masse est ionisé par bombardement électronique à 70 eV (énergie standard d'ionisation), l'énergie d'ionisation moyenne d'un composé organique étant de l'ordre de 7-20 eV [70]. Les ions obtenus sont séparés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) par l'application d'un champ magnétique et/ou électrique, puis collectés par un détecteur [71]. L'ion moléculaire, s'il est détecté, permet la détermination de la masse moléculaire du composé. Les ruptures des liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire conduisent à la formation d'ions fragments caractéristiques, puisque ces cassures ne se font pas au hasard, mais selon des mécanismes bien déterminés [71]. L'ensemble de ces ions fragments constitue le spectre de masse dont la lecture permet l'identification de la molécule. L'ionisation par impact électronique est le seul procédé qui conduit à des spectres reproductibles. Ainsi, le spectre de masse d'une molécule constitue une empreinte facilement identifiable et quasiment unique, l'identification d'un composé dans une matrice se fait alors par comparaison du spectre de masse (MS) avec celui,

d'un standard connu ou par identification instantanée si la molécule recherchée est répertoriée dans les banques de spectre (spectrothèque).

Tableau IV.1. Analyse des pesticides par CG/MS :

<i>Pesticide</i>	<i>Conditions Expérimentales</i>	<i>Application</i>	<i>Réf.</i>
-Atrazine -Simazine -Ametryne	Colonne DB-5, (0.25 mm×30 ×0.25µm) Programmation de la température : 60°C (1 min) $\xrightarrow{20^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 150°C $\xrightarrow{10^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 280°C. gaz vecteur : He débit : 28 ml/min.	Eau	[72]
-Atrazine et métabolites	Colonne DB-5 (0.25 mm×30×0.25µm) Programmation de la température : 50°C (1 min) $\xrightarrow{6^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 280°C. gaz vecteur : He	Eau	[73]
-Simazine -Atrazine -Propazine	Colonne DB-5(0.25 mm×30m×0.25µm) Programmation de la température : 120°C (1 min) $\xrightarrow{30^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 190°C $\xrightarrow{4^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 240°C $\xrightarrow{45^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 295°C (5min). Mode d'analyse : SIM. gaz vecteur: He, débit : 0.7ml/min.	Eau	[74]

<i>pesticides</i>	<i>Conditions Expérimentales</i>	<i>Application</i>	<i>Références</i>
-Atrazine -Simazine -Cyanazine	<i>Colonne DB-5 (0.25 mm×25 m×0.25µm)</i> <i>Programmation de la température :</i> 90°C (0.5 min) $\xrightarrow{15^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 160°C $\xrightarrow{25^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 280°C (5min). <i>gaz vecteur : He, débit : 1.5 ml/min.</i>	<i>Eau</i>	[75]
Isoproturon et ses produits de dégradation	<i>Colonne DB-5 (0.25mm×30 m×0.25µm)</i> <i>Programmation de la température :</i> 50°C (1 min) $\xrightarrow{50^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 250 °C. <i>gaz vecteur : He</i>	-	[76]

IV.2. Conditions d'analyse des pesticides par GC/MS en mode SIM :

Toutes les analyses ont été faites sur des échantillons solubilisés dans l'Acétonitrile.

Des solutions de $9,29 \cdot 10^{-8}$ mol/l ($0,01 \mu\text{mol.l}^{-1}$) pour l'Atrazine, $9,92 \cdot 10^{-8}$ mol/l pour la Simazine et $9,96 \cdot 10^{-8}$ mol/l pour l'Isoproturon ainsi que les extraits d'eau cités précédemment sont injectées dans les conditions opératoires suivantes [72] :

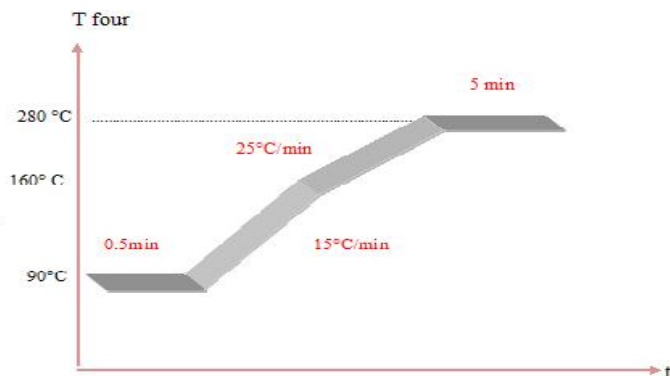
Le GC/MS est de marque (Agilent HP 6890) muni d'un injecteur automatique auto sampler (ALS HP 7683 B), le volume d'échantillon injecté est de 1 µL.

Pour ces analyses en GC/MS on utilise une colonne capillaire : en silice fondue (HP5-MS (5 % phenyl et 95% methyl polysiloxane) ; 30m x 0,25 mm, épaisseur de film : 0,25 µm).

Le gaz vecteur utilisé est l'Helium avec un débit de sortie de colonne égal à 0,5 ml/min.

Le mode d'injection : splitless (sans division d'entrée) où la température de l'injecteur est égale à 250°C.

L'analyse se fait en programmation de température selon le schéma suivant:



Programmation de température du four

Le spectromètre de masse quadripolaire (MSD HP 5973) utilisé est en mode impact électronique (EI).

- ✓ Energie d'ionisation : 70 ev.
- ✓ Température du détecteur où :
 - source : 230 °C.
 - Quadripole : 150°C
 - Interface : 280 °C

L'analyse des résultats se fait en utilisant le logiciel d'acquisition et de traitement MSD ChemStation (Agilent).

IV.3.Résultats et discussion :

Lors de l'analyse des spectres de masse, l'utilisation du spectre complet s'avère parfois impossible en raison de la présence de spectres inutiles (non recherchés) et au bruit de fond important, il est donc utile d'injecter les échantillons en mode sélection des ions « Singles Ions Monitoring » (SIM) [77]. Dans ce mode le spectromètre de masse agit comme un filtre en se focalisant uniquement sur les ions caractéristiques des produits recherchés, il apporte ainsi une sensibilité plus importante que dans le mode de balayage de l'ensemble des masses, « full scan mode ». Le **Tableau IV.2** regroupe les principaux ions caractéristiques ainsi que les temps de rétention obtenus pour les pesticides recherchés dans ce travail.

Tableau. IV.2 : Temps de rétention et ions caractéristiques des pesticides recherchés.

pesticides	Famille chimique	Masse Moléculaire	Ions caractéristiques	Temps de Rétention (Min.)
Atrazine	Triazine	215,16	215-200	9,20
Simazine	Triazine	201,66	201-186	9,08
Isoproturon	Urée	206.68	161-146-128	5,72

IV.4. Analyse des pesticides étudiés par GC/MS :

Les chromatogrammes des trois pesticides étudiés, leurs spectres de masse sont présentés respectivement dans les figures (IV.1, IV.2, IV.4, IV.5, IV.7, VI.8) .

1-Atrazine

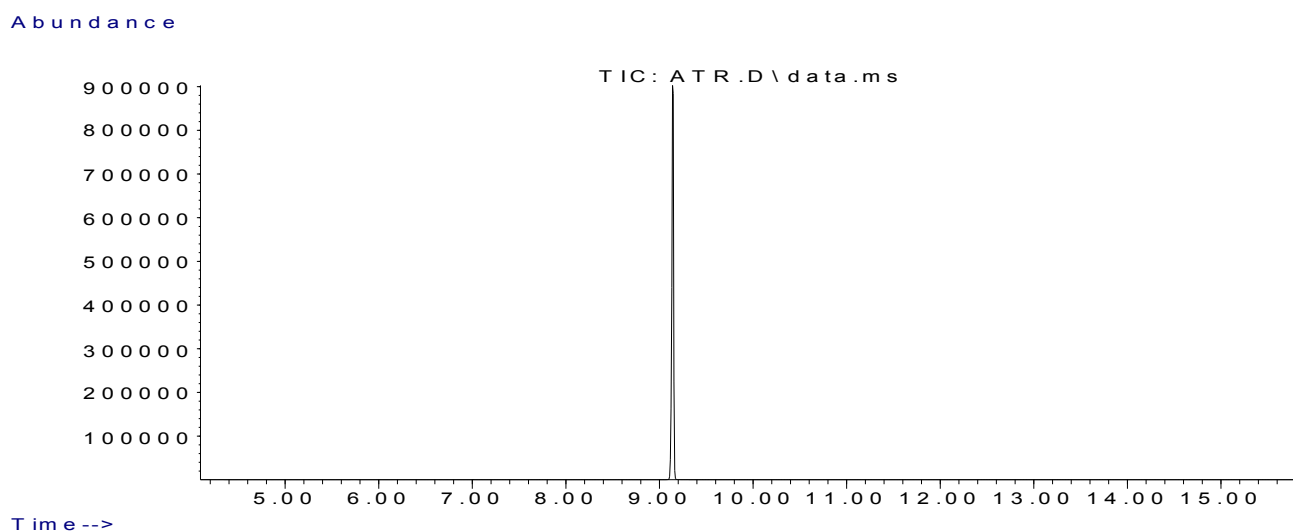


Figure IV.1 : Chromatogramme de l'Atrazine.

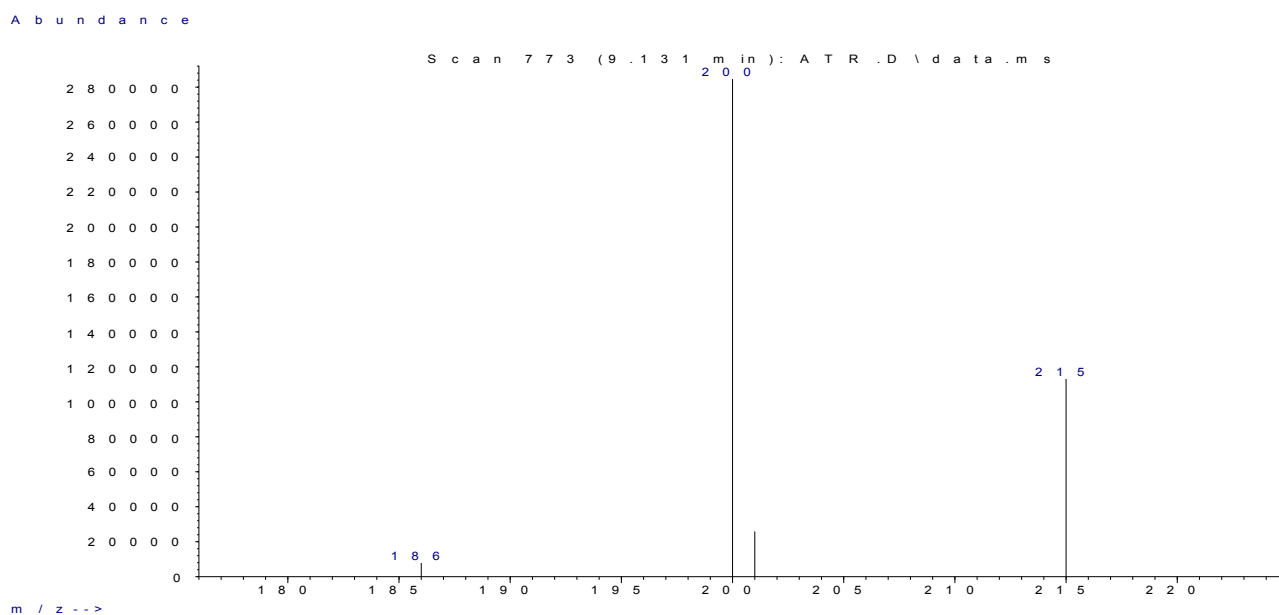


Figure IV.2: Spectre de masse de l'Atrazine en mode SIM.

Le spectre de masse (EI) de l'atrazine est bien connu et la dissociation induite par collision à permis à certain auteurs d'attribuer tous les fragments observés [78]. Pour la recherche de cette molécule en mode SIM dans les différents extraits d'eau naturelle. Nous nous sommes limités dans ce travail aux deux pics les plus intenses ($m/z= 215,200$), correspondant respectivement à l'ion moléculaire et un des ions caractéristiques.

Sur la base des ions fragments obtenus, des mécanismes de fragmentation proposée dans la littérature sont représentés dans la **Figure.IV.3**.

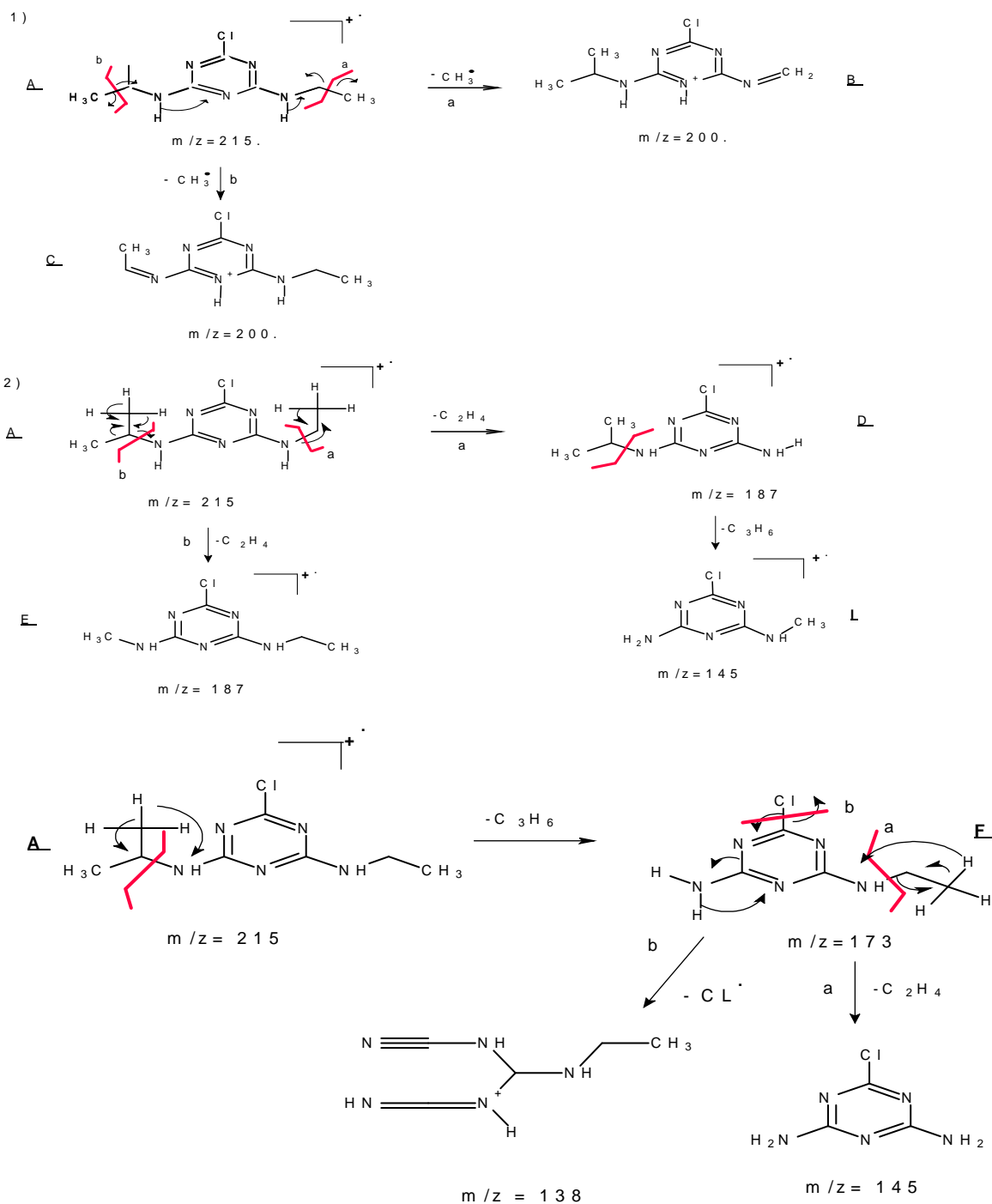


Figure. IV.3: mécanismes de fragmentation de l'Atrazine.

2) Simazine :

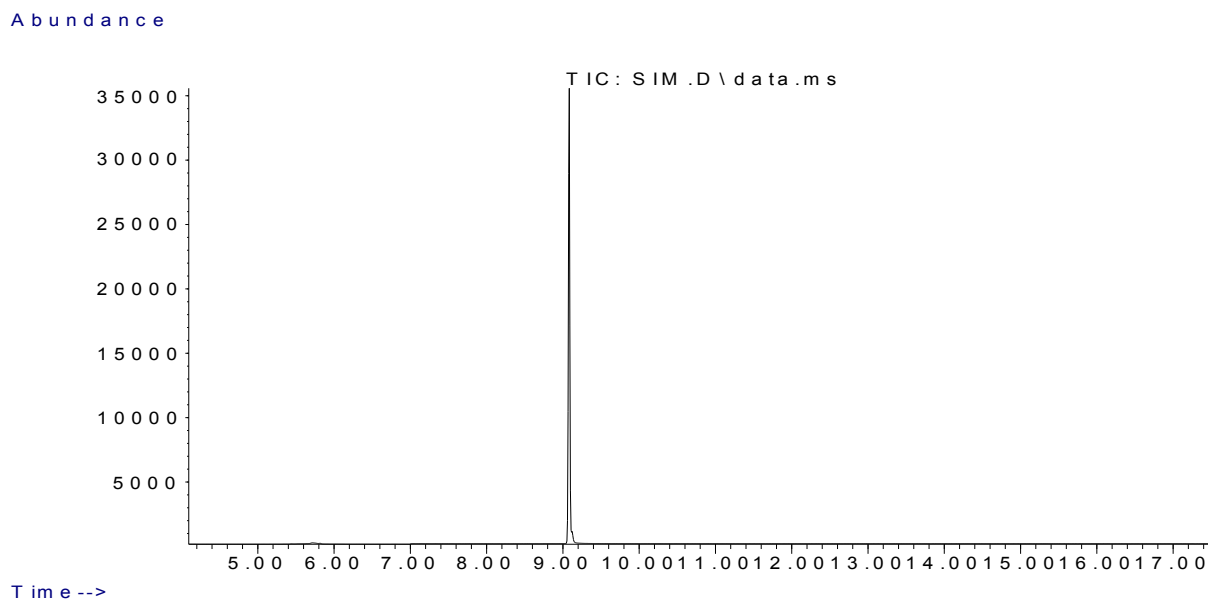


Figure. IV.4 : chromatogramme de la Simazine

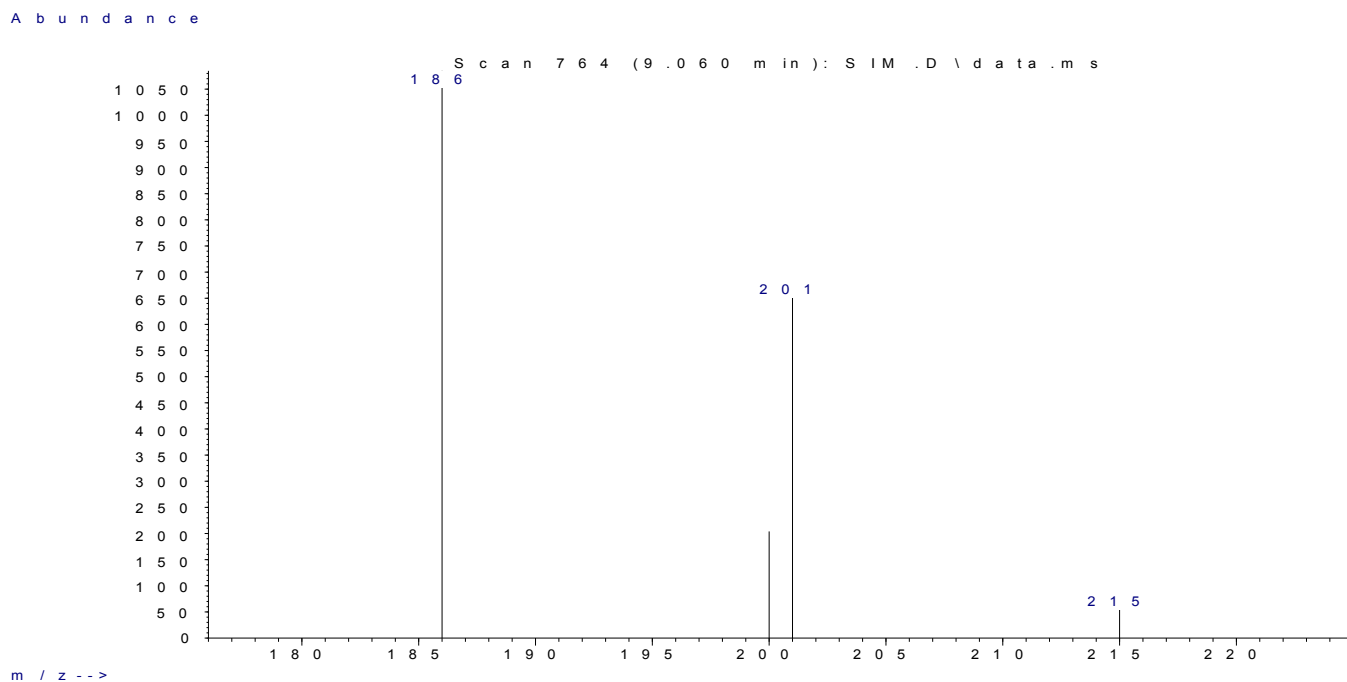


Figure IV.5 : spectre de masse de la Simazine en mode SIM.

Pour la Simazine nous avons choisit les deux pics suivants : $m/z= 201$, 186 correspondant respectivement au pic moléculaire et à un pic caractéristique. Les mécanismes de fragmentation menant aux pics choisis sont schématisés dans la **Figure.IV.5**.

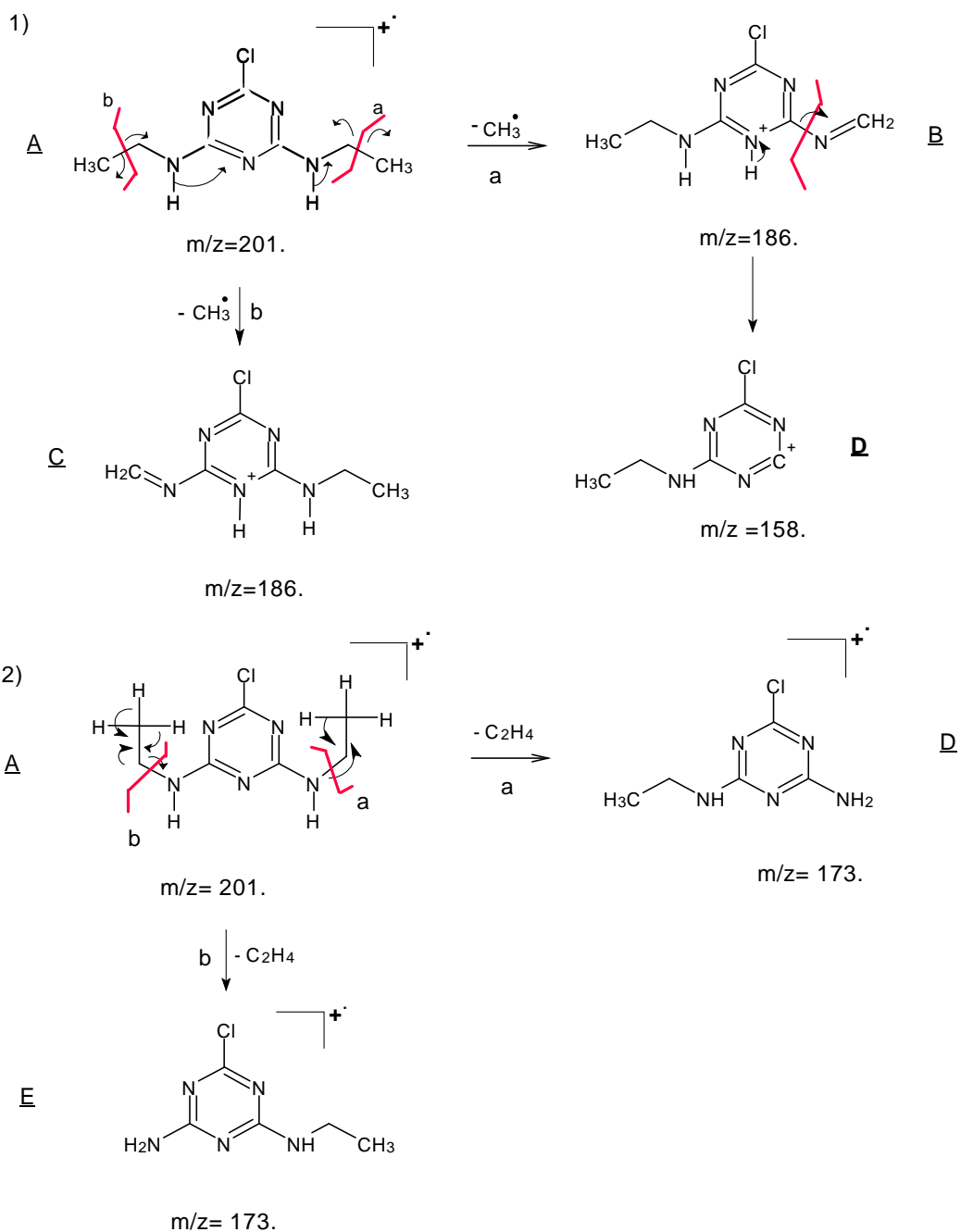


Figure IV.6 : Mécanisme de fragmentation de la Simazine.

3) Isoproturon :

Pour l'Isoproturon nous avons choisis les trois pics: 161, 146, 128

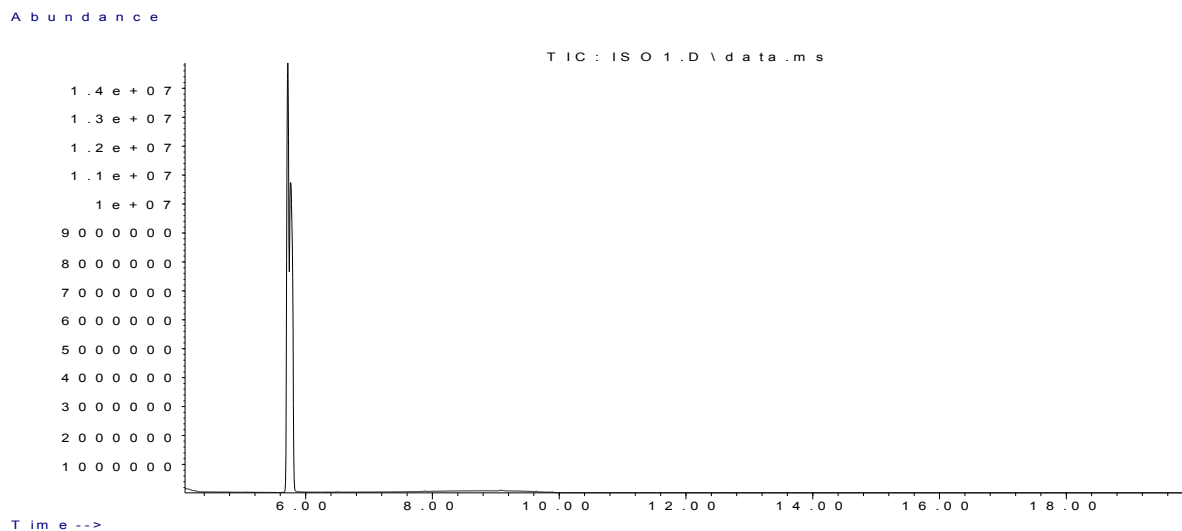


Figure. IV.7 : chromatogramme de L'Isoproturon.

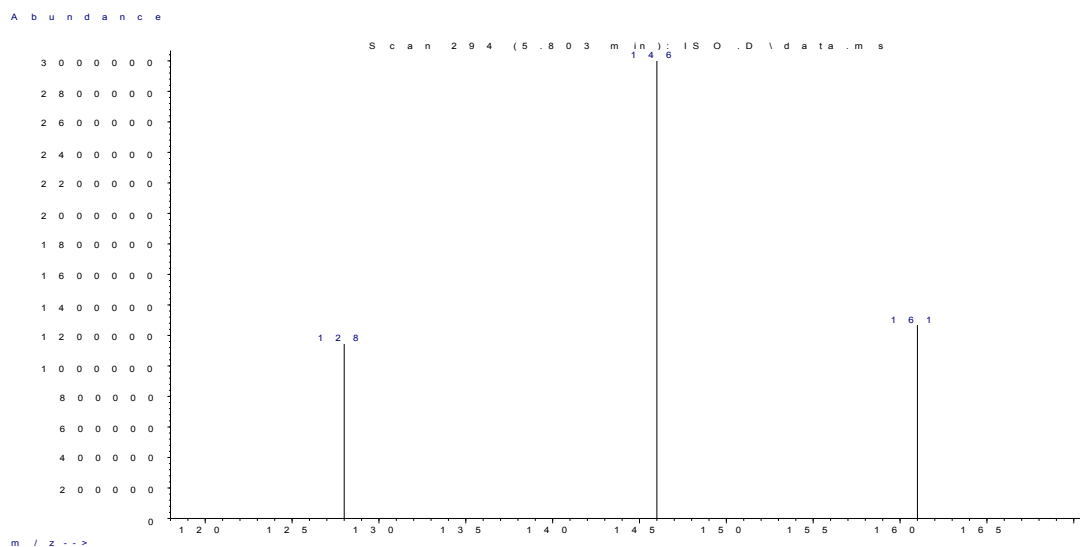


Figure.IV.8: Spectre de masse de l'Isoproturon en mode SIM.

Les mécanismes de fragmentation de l'isoproturon sont présentés dans la **Figure.IV.8**. Ainsi le pic à $m/z = 206$ correspond à l'ion moléculaire M^+ , l'ion fragment de masse $m/z = 191$ résulte de la perte d'un radical CH_3^\bullet , l'ion 146 résulte de la perte consécutive de $(CH_3)_2NH$.

Pour l'ion à $m/z=72$, il correspond probablement au fragment $(\text{CH}_3)_2\text{NCO}^+$. L'ion fragment $m/z=161$ résultent de la perte de d'un groupement NO et de celle l'hydrogène.

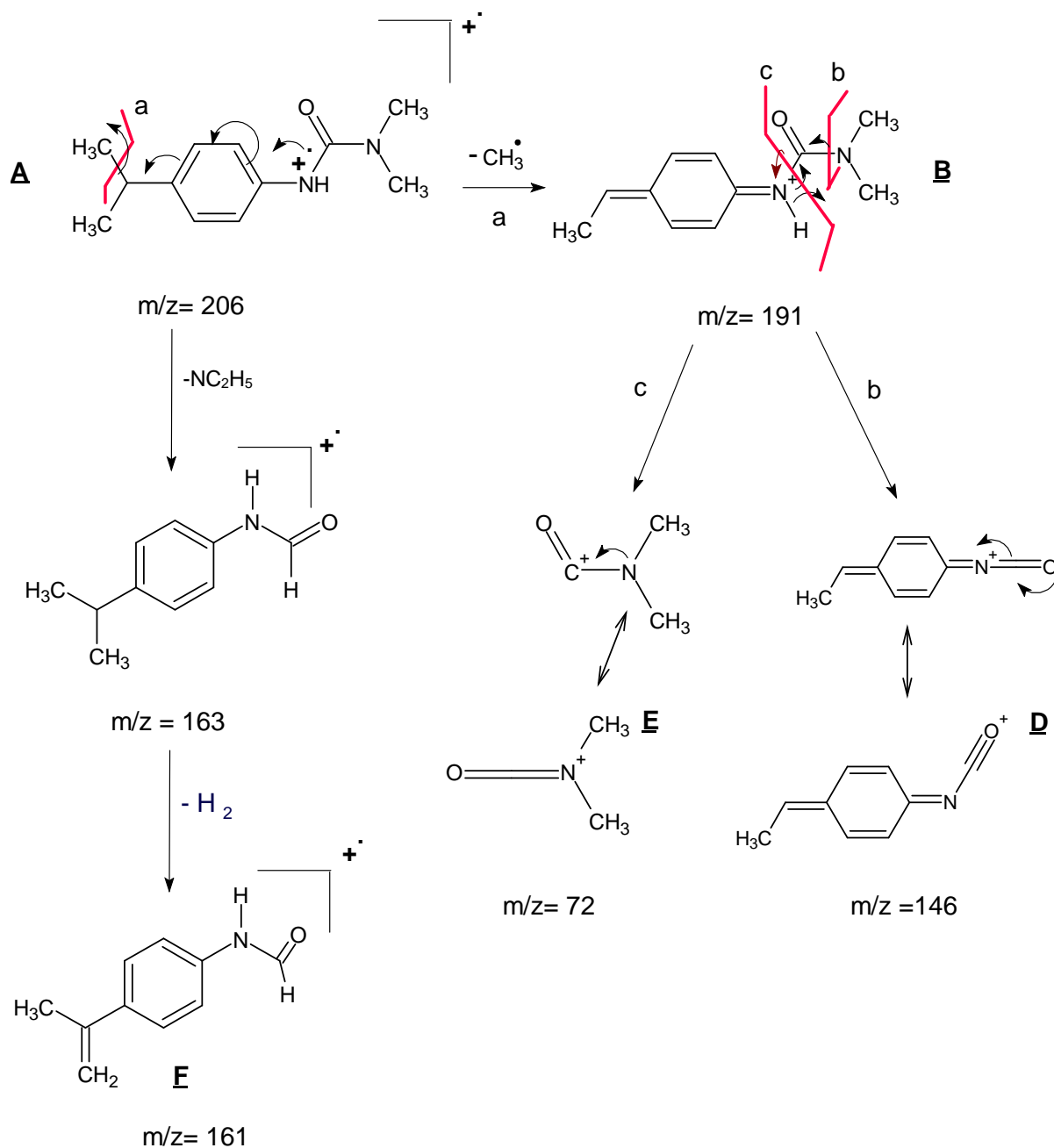


Figure. IV.9 : Mécanisme de fragmentation de l'Isoproturon.

IV.5. Identification des pesticides dans les eaux naturelles :

Dans l'analyse couplée à la spectrométrie de masse, l'identification des composés se fait généralement sur la base de la comparaison des spectres de masse des échantillons à analyser avec ceux des étalons connus. Les intensités des pics ne doivent pas différer de 5% de celles obtenues à partir d'un étalon injectée dans les mêmes conditions. D'autre part, la comparaison du temps de rétention constitue une confirmation supplémentaire, car il existe parfois des molécules présentant les mêmes ions caractéristiques [79].

Dans le but de rechercher les trois pesticides à savoir : l'atrazine, la simazine et l'isoproturon dans nos extraits d'échantillons d'eaux en provenance des cinq zones agricoles et d'une eau issues de la station d'épuration de Boudouaou. Nous allons dans ce qui suit comparer les différents chromatogrammes obtenus des six extraits avec ceux des étalons préalablement injectés.

1-Echantillon de Ain-Taya : Les *figures IV.10-13* montrent les différents chromatogrammes de l'eau de Ain-Taya analysé par GC/MS. SIM.

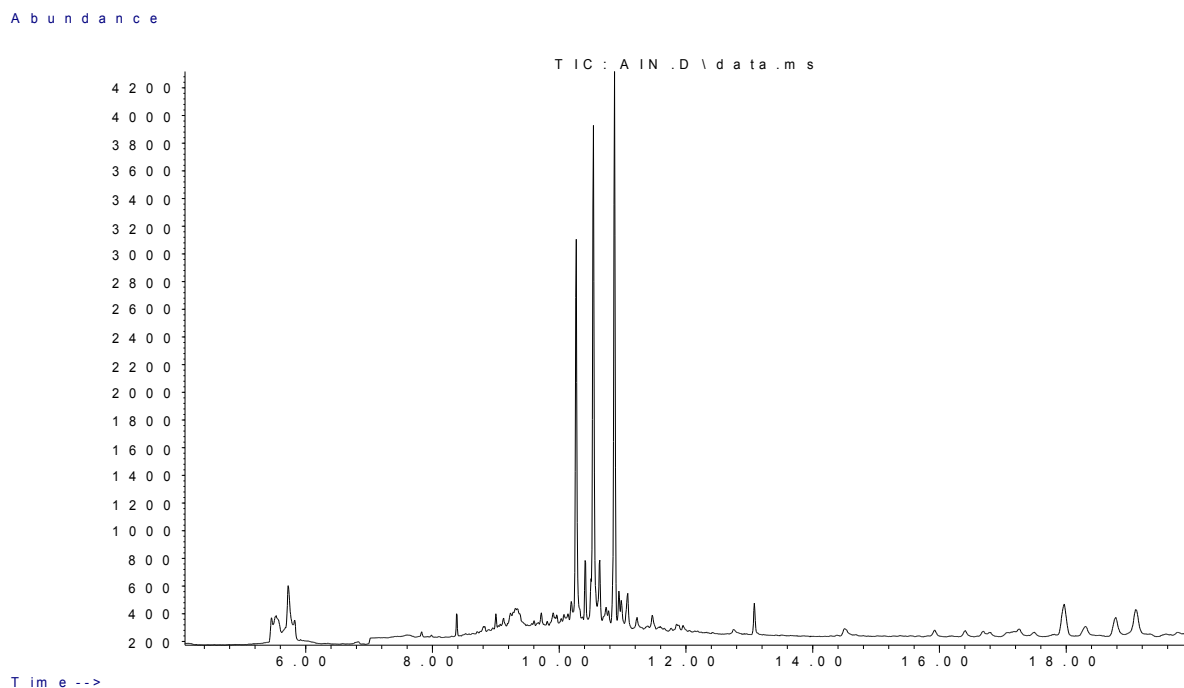


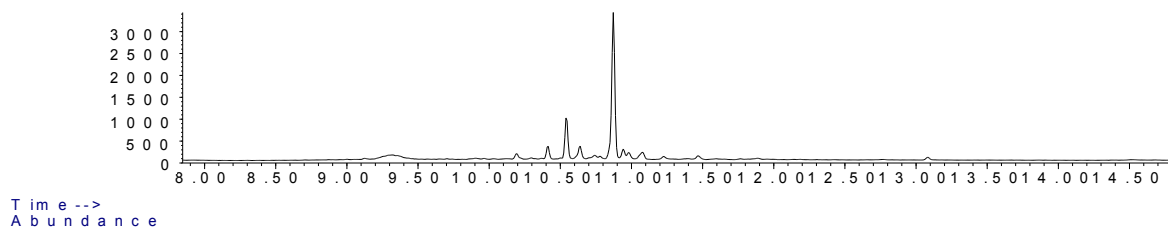
Figure. IV.10 : Chromatogramme GC/MS en mode SIM de l'échantillon Ain-Taya.

Recherche des pesticides

Atrazine : $Tr= 9.20\text{ min}$

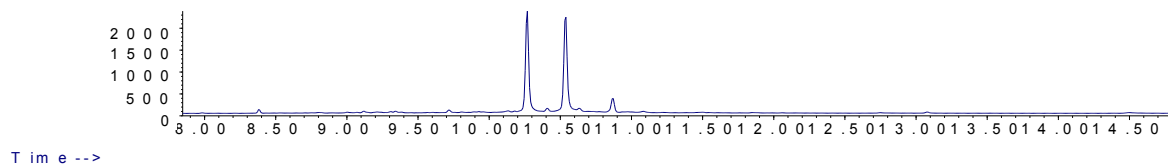
Abundance

Ion 215.00 (214.70 to 215.70): AIN.D\data.ms



Time-->
Abundance

Ion 200.00 (199.70 to 200.70): AIN.D\data.ms



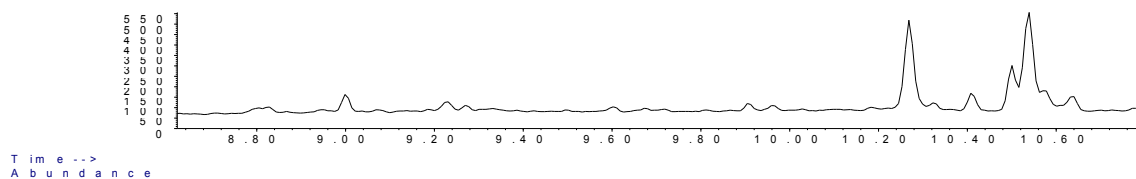
Time-->

Figure IV.10.A: Chromatogramme GC/MS en mode SIM de l'Atrazine.

Simazine : $Tr= 9.08\text{ min}$

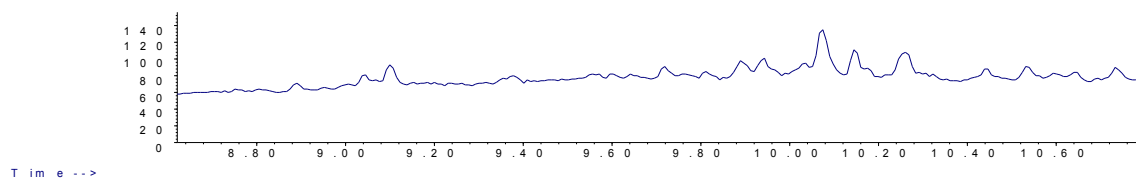
Abundance

Ion 201.00 (200.70 to 201.70): AIN.D\data.ms



Time-->
Abundance

Ion 186.00 (185.70 to 186.70): AIN.D\data.ms



Time-->

Figure IV.10.B : Chromatogramme GC/MS en mode SIM de la Simazine.

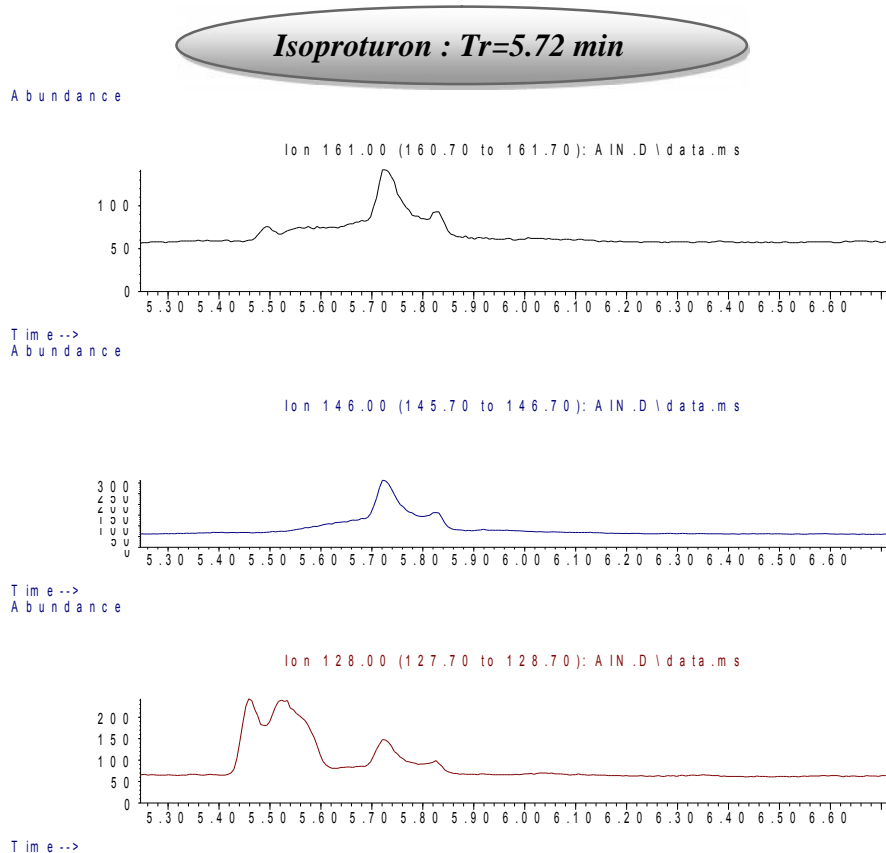


Figure IV.10.C : Chromatogramme GC/MS en mode SIM de l'Isoproturon.

Après analyse des chromatogrammes obtenus pour les trois pesticides recherchés dans l'échantillon d'eau de Ain-Taya nous avons observé la présence de pics correspondants aux même ions caractéristiques mais avec des temps de rétention très différents, si on prend comme exemple l'atrazine qui sort dans ces condition à T=9.47 (ions caractéristique= 215,200), le spectre de masse de l'extrait d'eau présente bien des pics à m/z= 215 à T= 11 min , et un pic à m/z=200 à T=10.5 min, des temps de rétention différents de celui de l'atrazine, ceci nous amène à conclure que l'échantillon ne présente aucune trace de ce xenobiotique.

2-Echantillon de Bench bane : Les *Figure.IV.* représentent respectivement le chromatogramme d'extrait d'eau de Bench bane obtenu par GC/MS.SIM.

Abundance

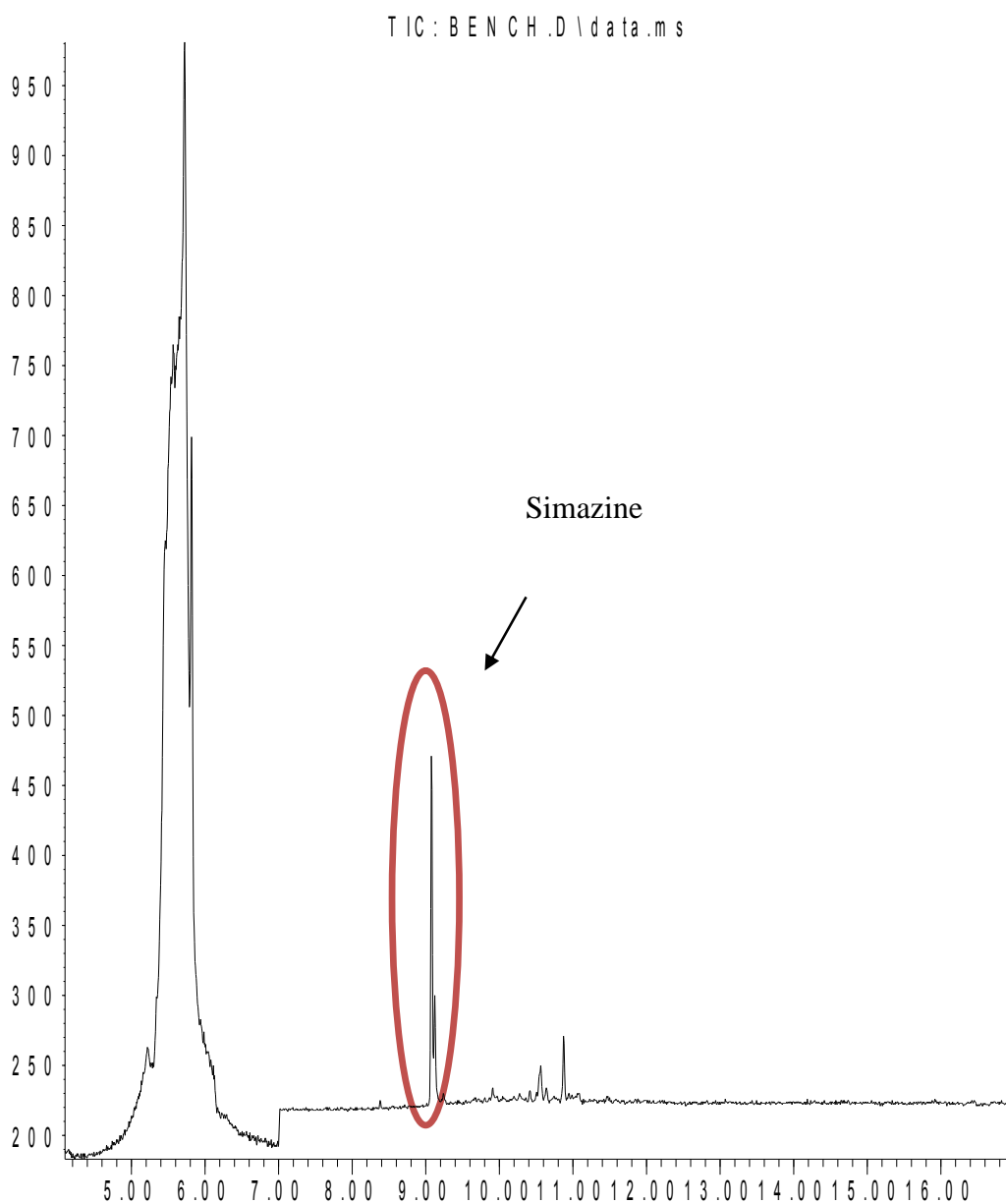


Figure. IV.11: Chromatogramme GC/MS en mode SIM de l'échantillon de Bench bane

Recherche des pesticides :

Atrazine : Tr= 9.20 min

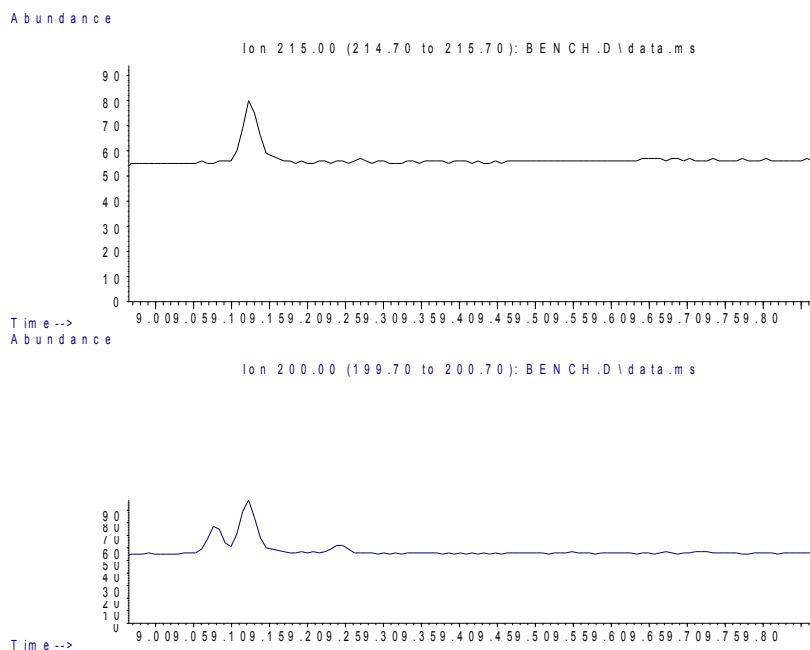


Figure IV.11.A: Chromatogramme GC/MS en mode SIM de l'atrazine.

Simazine : Tr= 9.08 min

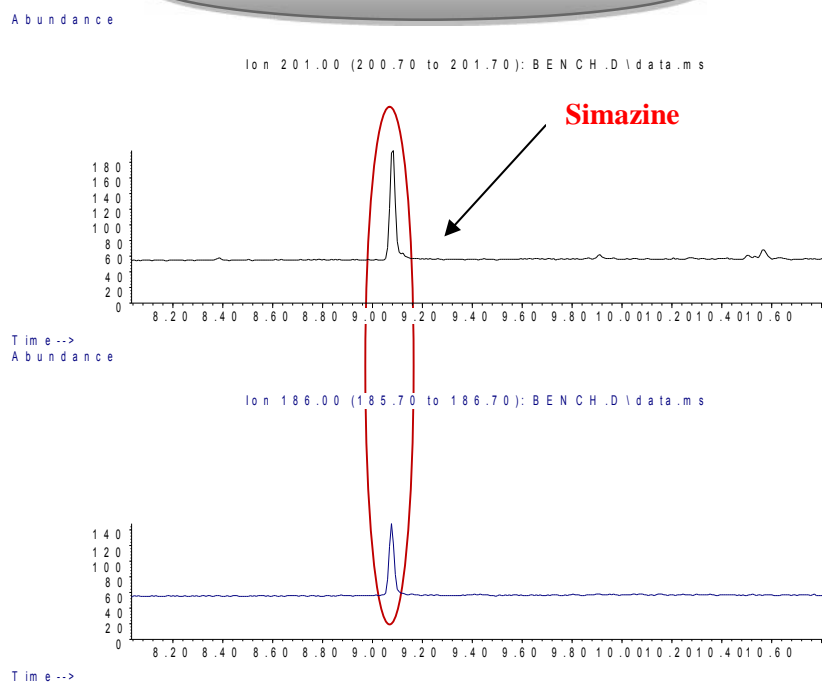


Figure IV.11.B: Chromatogramme GC/MS en mode SIM de la simazine

Isoproturon : Tr=5.72 min

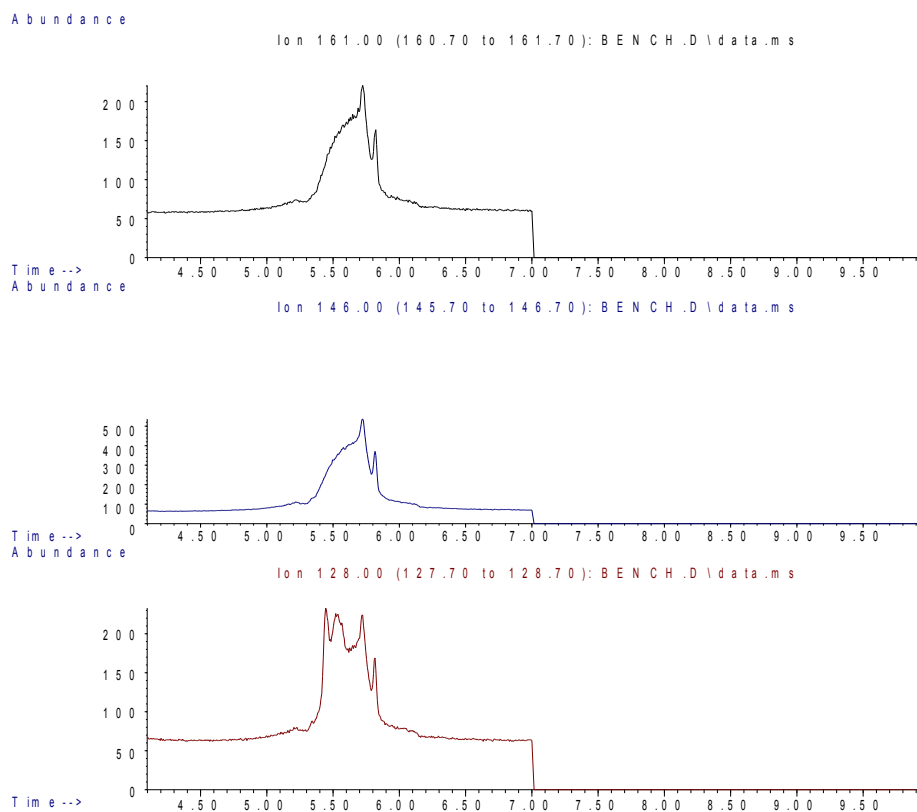


Figure. IV.11.C: Chromatogramme en mode SIM de l'Isoproturon

L'analyse des résultats obtenus pour cet extrait d'eau nous a permis de relever la présence de résidus de la Simazine. Ceci est en effet confirmé par la présence de pics chromatographique possédant les mêmes ions caractéristique pour un temps similaire à celui de la Simazine.

3-Echantillon de Birtouta :

Les figures ci-dessous présentent les chromatogrammes résultant de l'injection de l'échantillon d'eau de Birtouta par GC/MS dans le mode SIM.

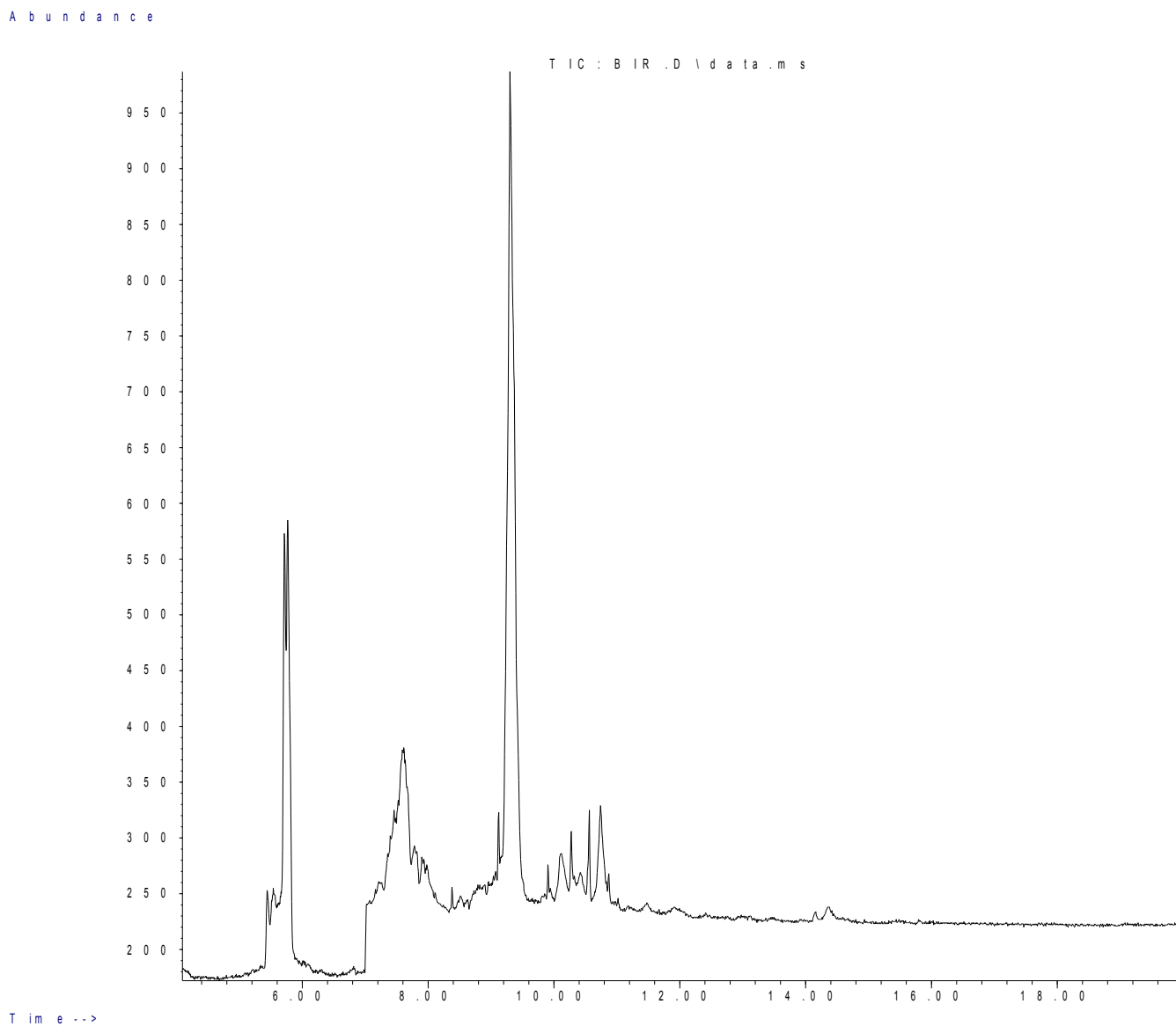


Figure. IV.12 : Chromatogramme GC/MS de l'échantillon de Birtouta.

Recherche des pesticides :

Atrazine : Tr= 9.20 min

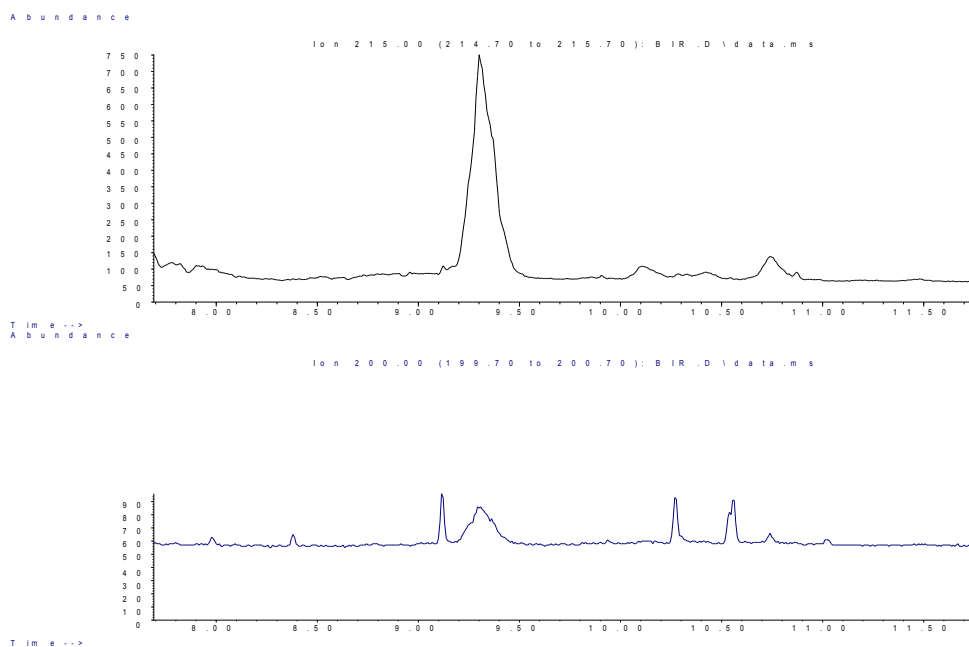


Figure IV.12.A: Chromatogramme GC/MS en mode SIM de l'Atrazine.

Simazine : Tr= 9.08 min

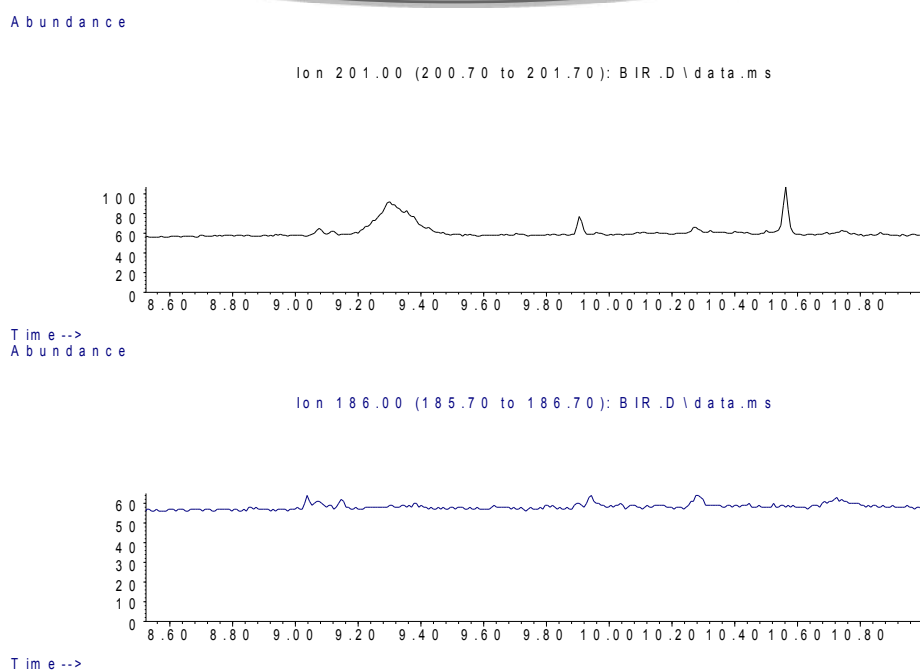


Figure IV.12.B: Chromatogramme GC/MS en mode SIM de la Simazine.

Isoproturon : Tr=5.72 min

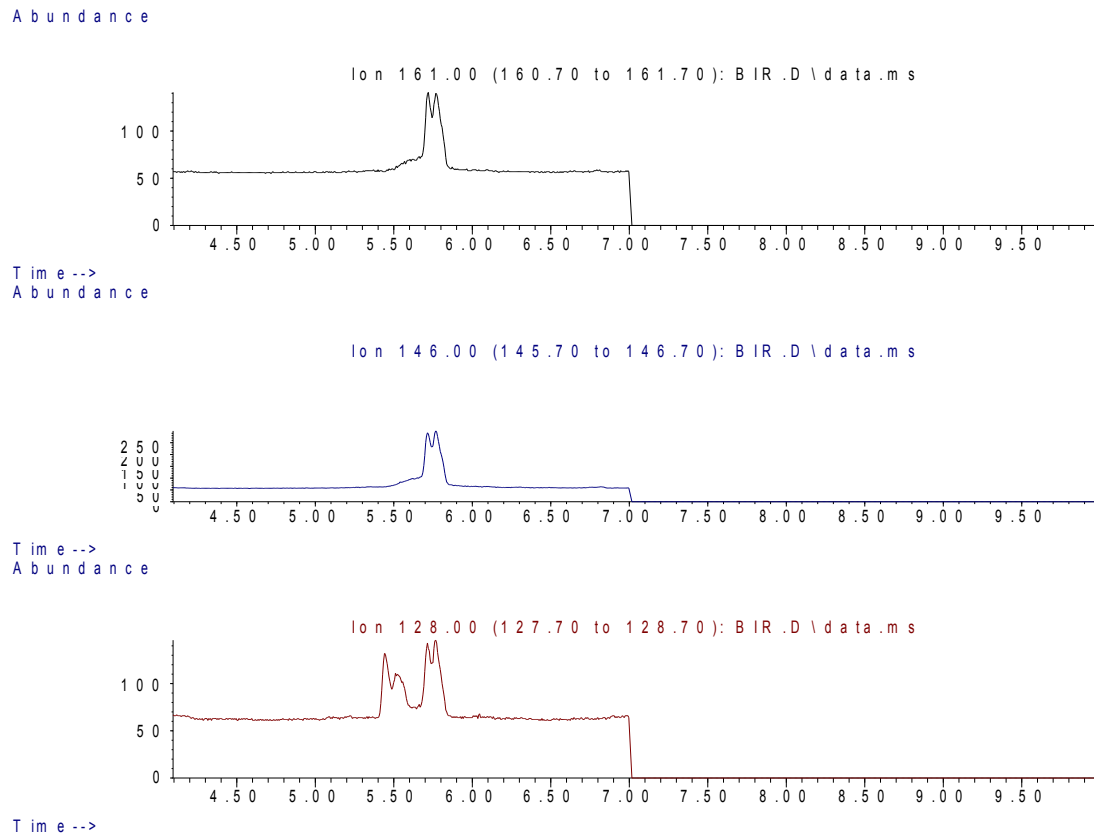


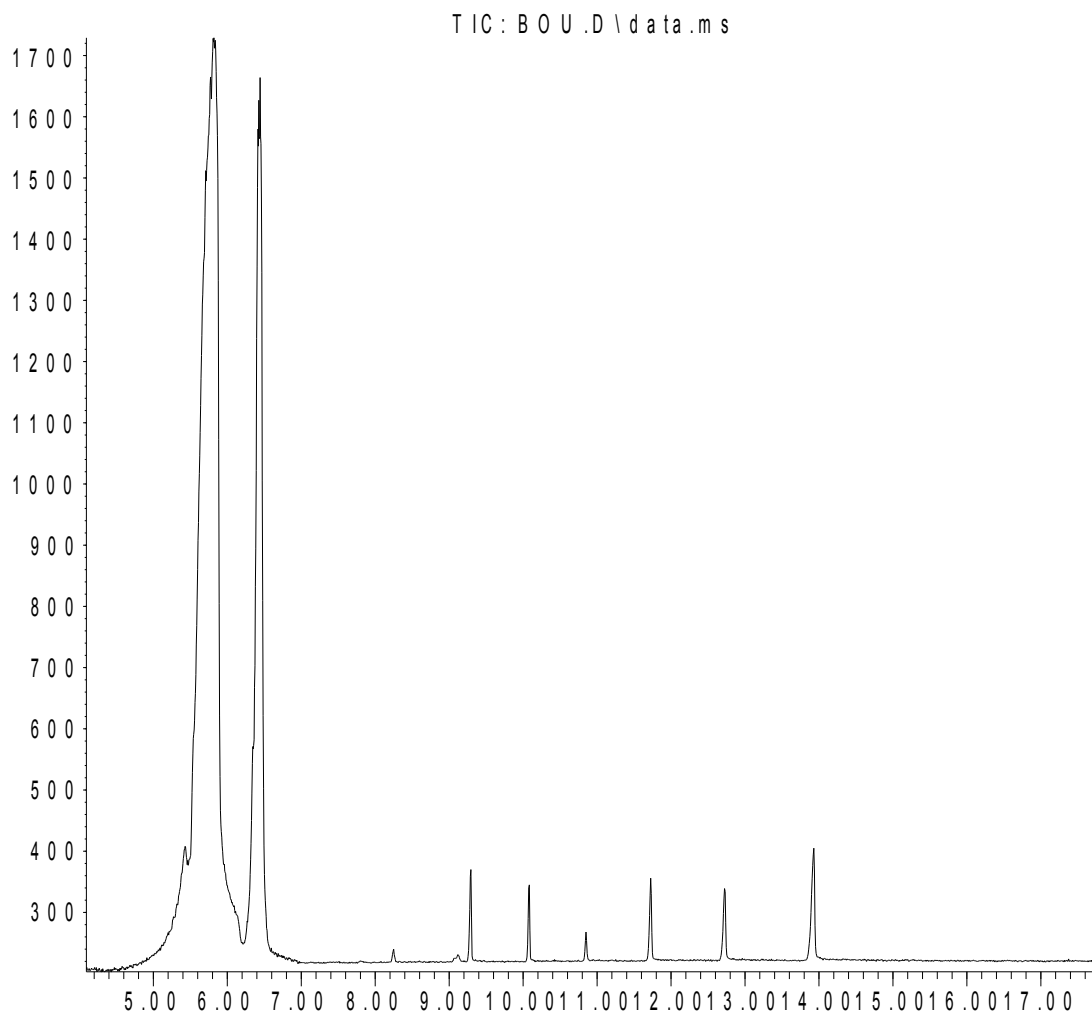
Figure IV.12.C: Chromatogramme GC/MS en mode SIM de la Simazine

Les résultats obtenus montrent l'absence de toute trace de ces trois pesticides dans l'extrait d'eau de l'échantillon de la localité de Birtouta.

4-Echantillon de la station d'épuration de Boudouaou :

Les chromatogrammes obtenus par GC/ MS de l'extrait d'eau de la station d'épuration de Boudouaou sont présentés respectivement dans les figures IV.13.

Abundance



Time-->

Figure. IV.13.Chromatogramme GC/MS dans le mode SIM de l'eau de Boudouaou.

Recherche des pesticides :

Atrazine : Tr= 9.20 min

+++++++

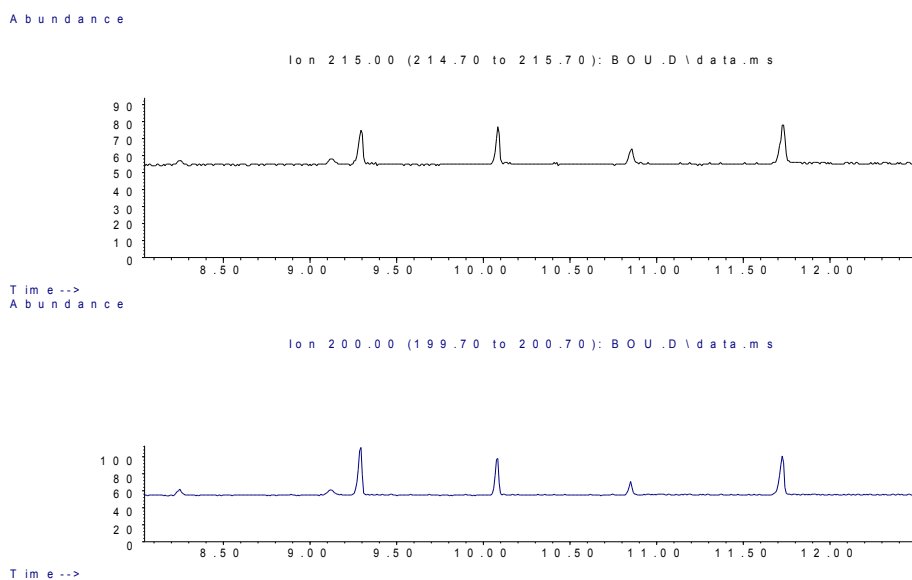


Figure .IV.13.A : chromatogramme en mode SIM de l'Atrazine.

Simazine : Tr= 9.08 min

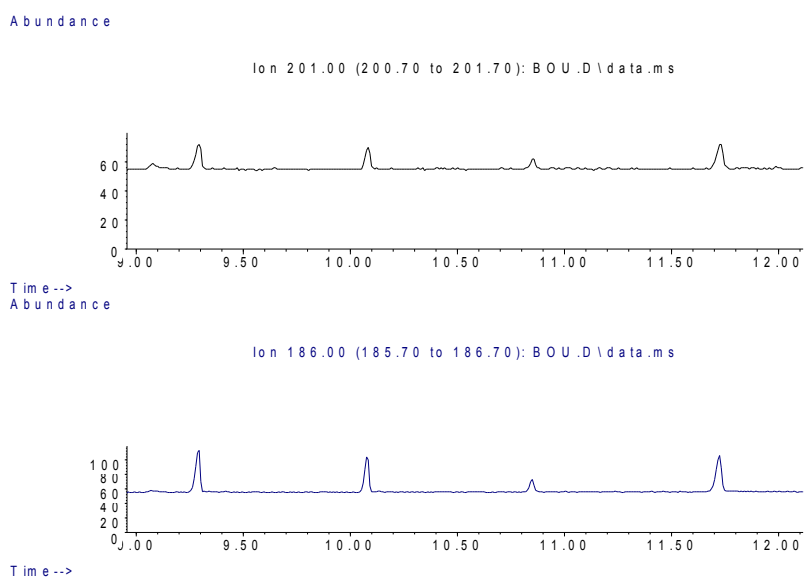


Figure .IV.13.B : chromatogramme en mode SIM de la Simazine.

Isoproturon : Tr=5.72 min

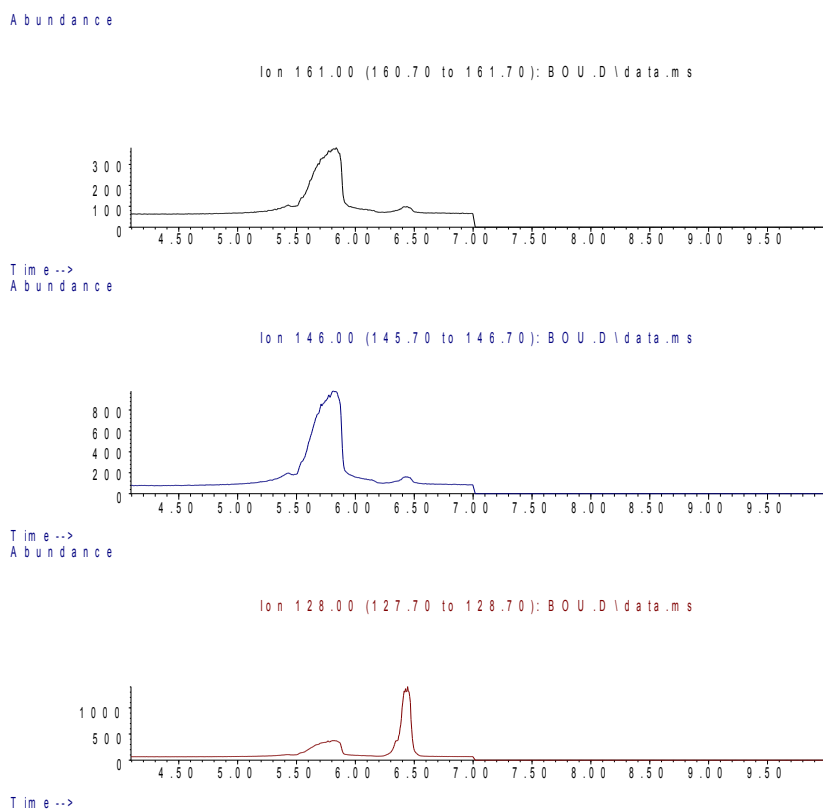


Figure. IV.13.C chromatogramme en mode SIM de l'isoproturon.

Après analyse des chromatogrammes ainsi obtenus en utilisant les différents ions caractéristiques pour les trois pesticides, nous concluons qu'aucune trace de pesticides n'a été décelée pour l'échantillon issu de la station d'épuration de Boudouaou. Néanmoins, nous constatons la présence des mêmes ions caractéristiques mais avec des temps de rétention différents.

5-Echantillon de Boufarik :

La **figure IV. 14.** Présente l'analyse par GC/MS en mode SIM de l'échantillon d'eau en provenance de la zone agricole de Boufarik.

Boufarik

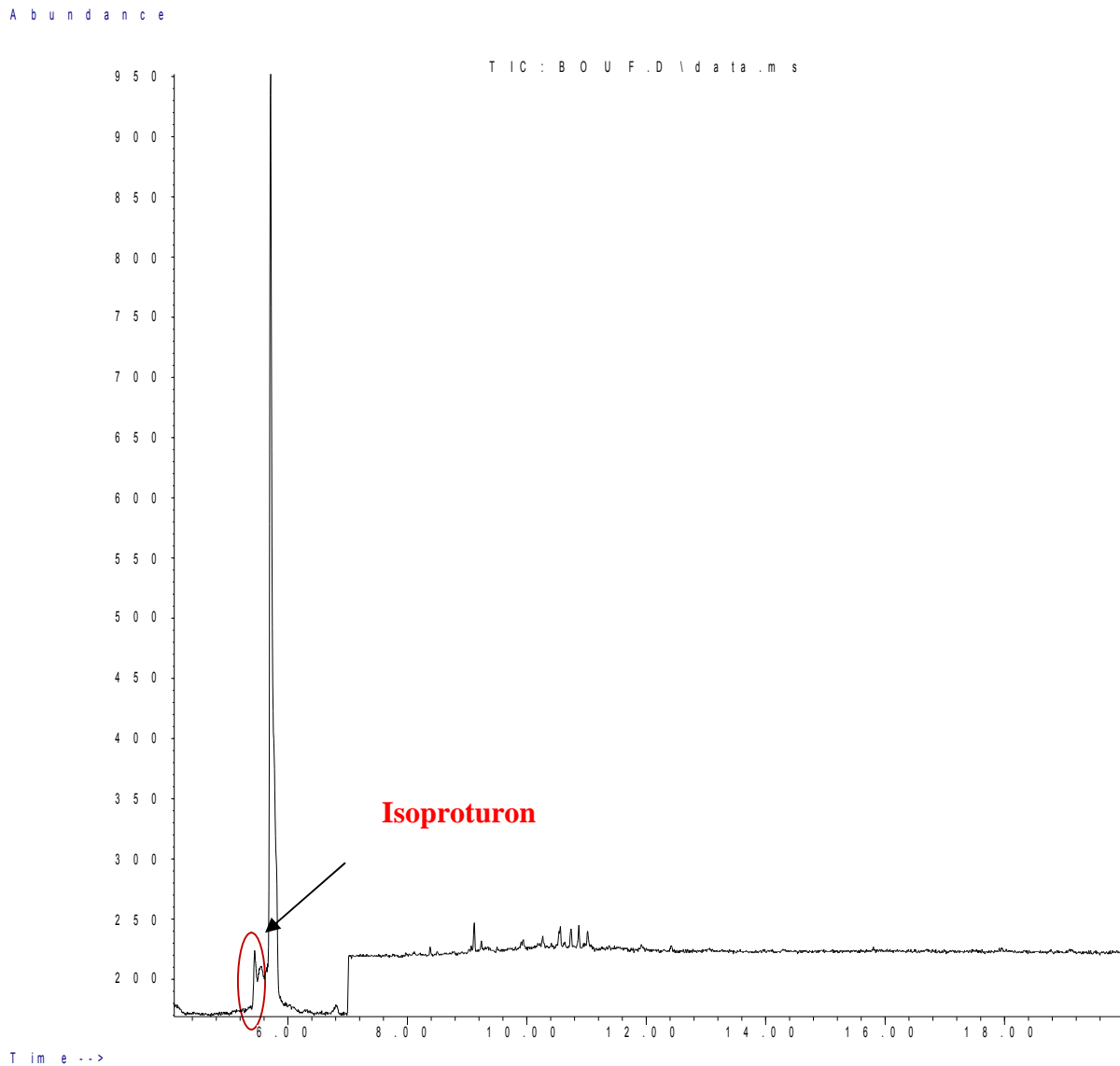


Figure. IV.14. chromatogramme GC/MS en sélection des ions présents dans l'échantillon de Boufarik.

Recherche des pesticides :

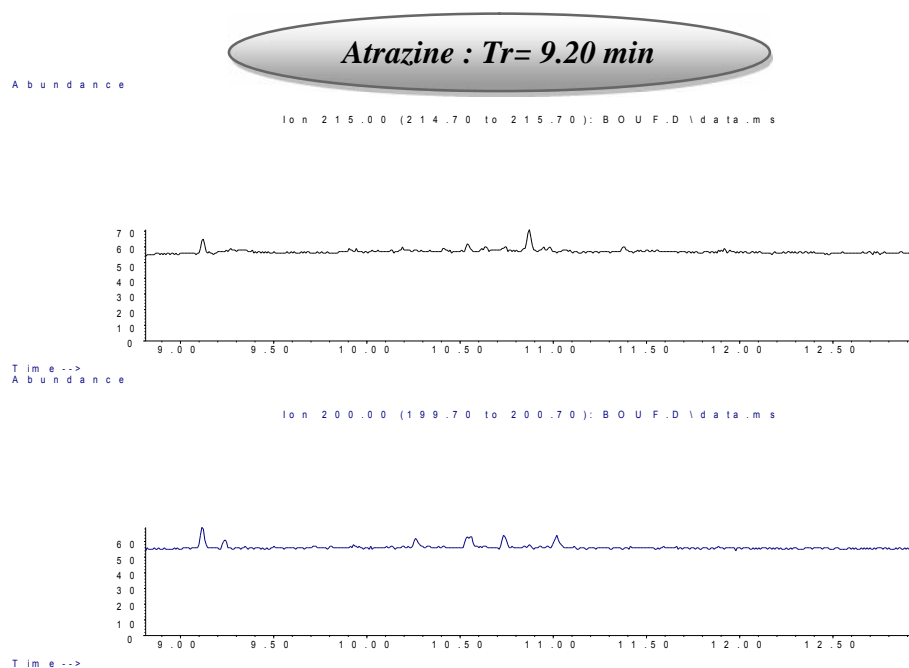


Figure. IV.14.A : chromatogramme en mode SIM de l'Atrazine.

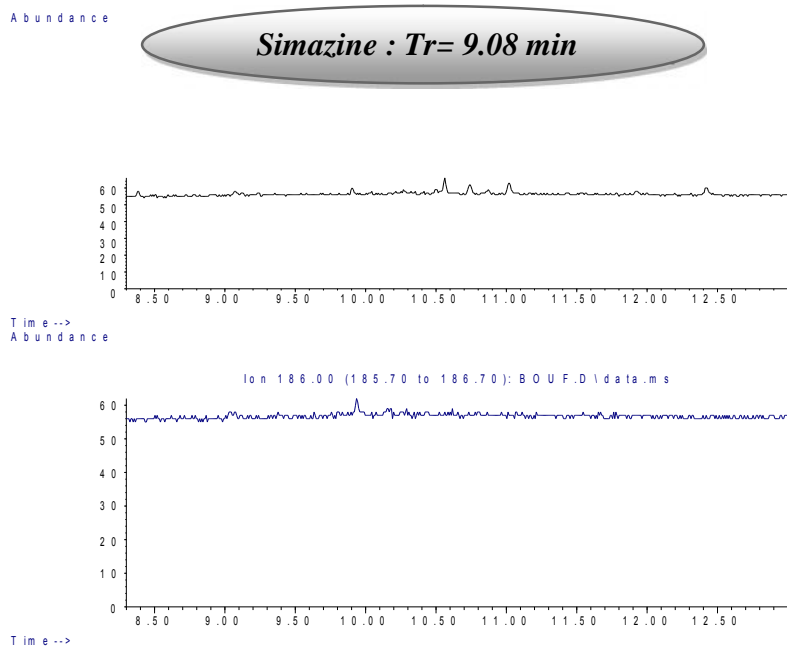


Figure. IV.14.B : chromatogramme en sélection des ions De la Simazine.

Isoproturon : Tr=5.72 min

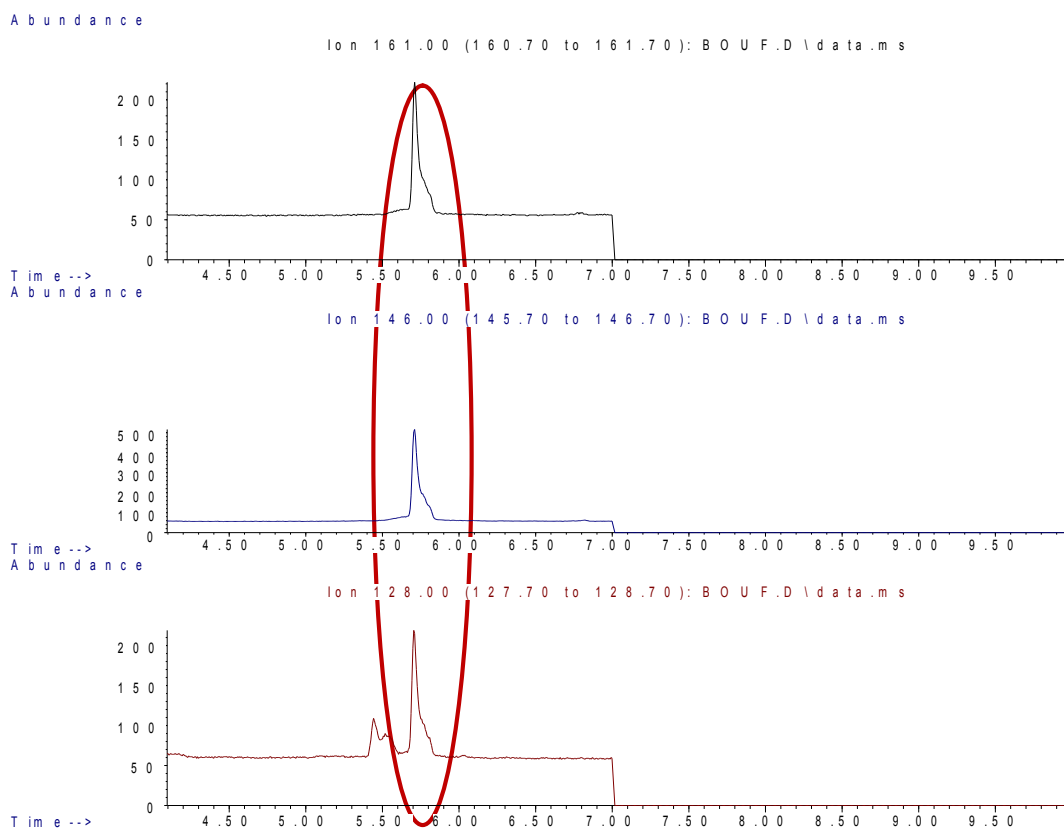


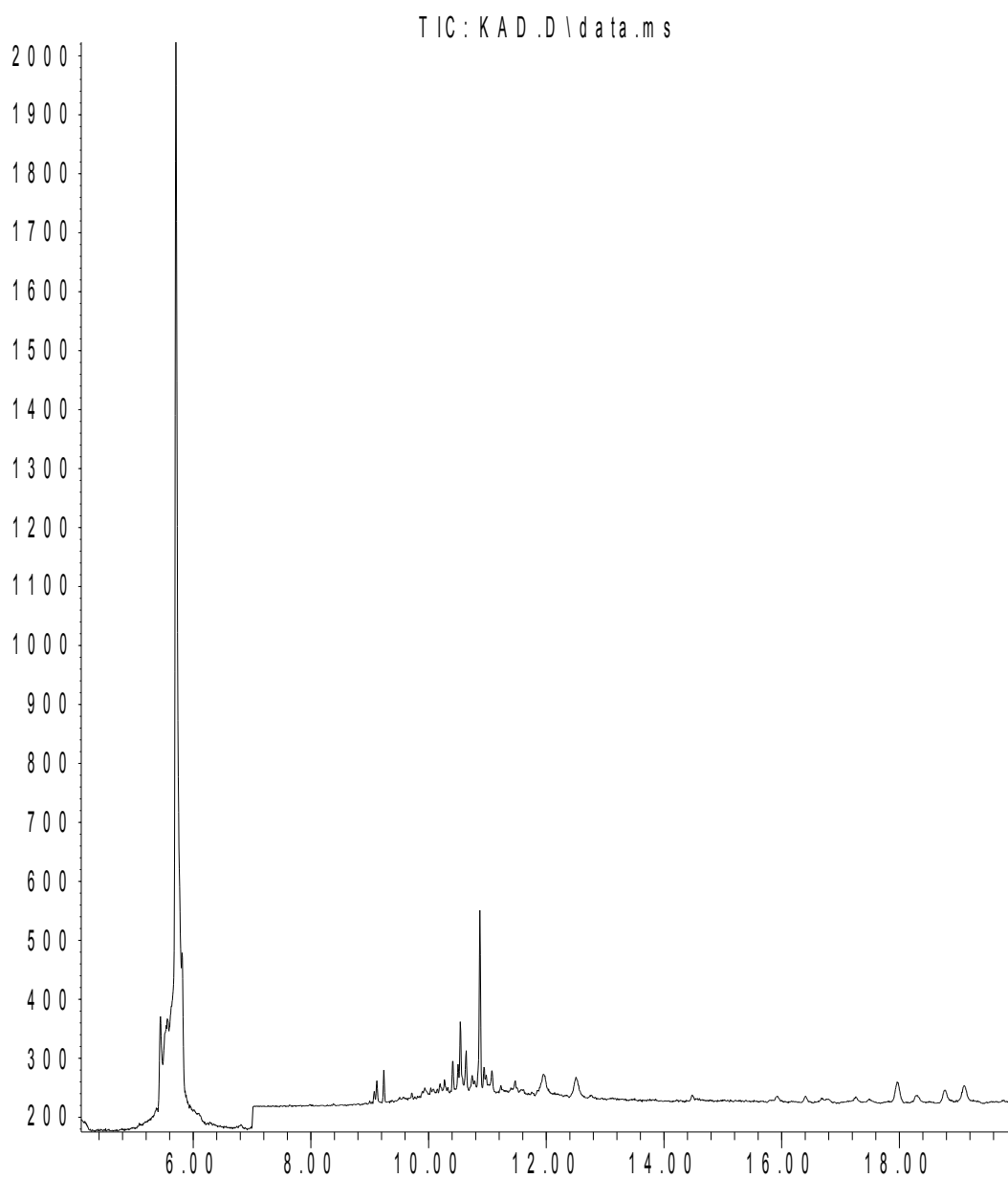
Figure. IV.14.C: chromatogramme en mode SIM de l'isoproturon.

L'analyse des chromatogrammes en mode SIM pour l'échantillon de Boufarik indique la présence des mêmes ions caractéristique obtenus pour l'isoproturon avec un temps de rétention identique, ceci confirme bien la présence de ce polluant potentiel dans cet échantillon d'eau.

6-Echantillon d'El-Kadous :

La figure IV.15 présente le chromatogramme obtenu lors de l'analyse de l'extrait d'eau issu de la zone agricole d'El-Kadous.

Abundance



Time -->

Figure. IV15.Chromatogramme GC d'El-Kadous.

Recherche des pesticides

Atrazine : Tr= 9.20 min

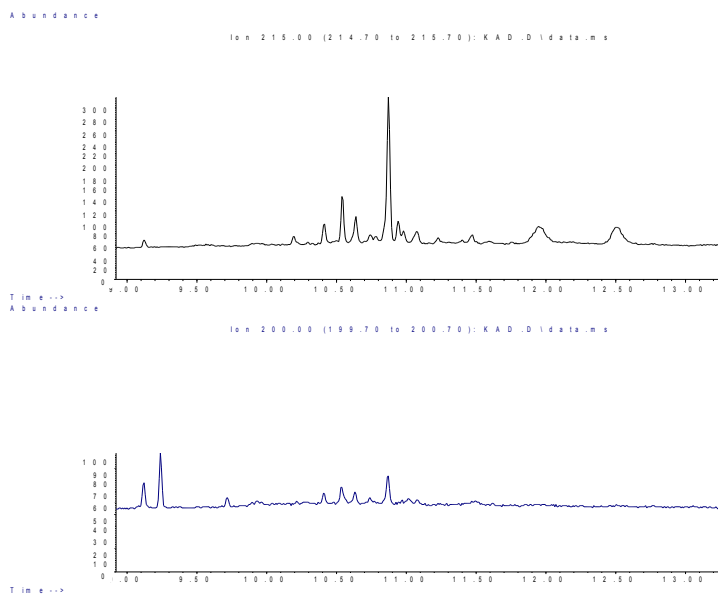


Figure. IV.15.A: chromatogramme en mode SIM de l'Atrazine.

Simazine : Tr= 9.08 min

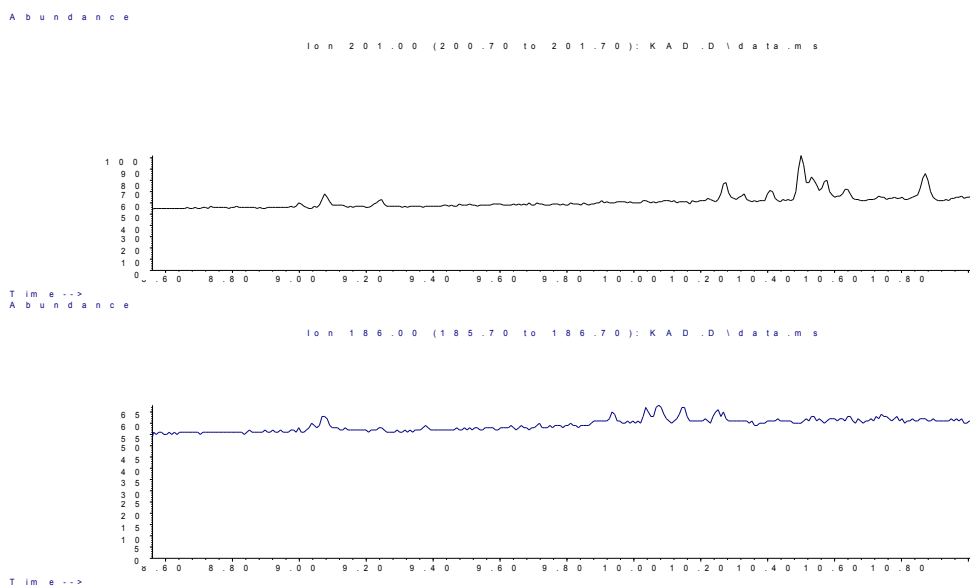


Figure. IV.15.B chromatogramme en mode SIM de la Simazine.

Isoproturon : $Tr=5.72$ min

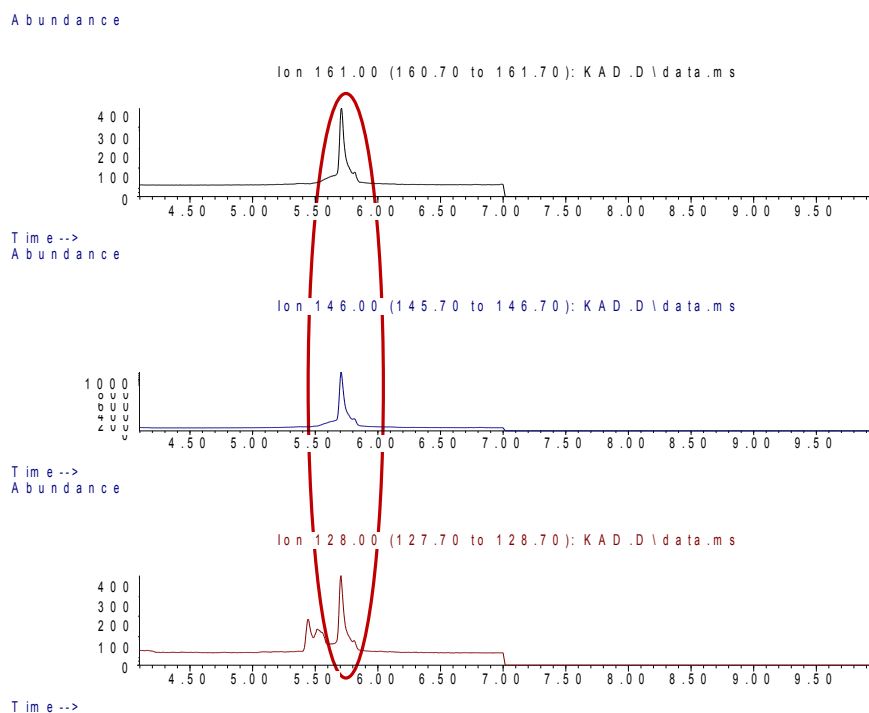


Figure. IV.15.C: chromatogramme en mode SIM de la simazine.

l'analyse en mode SIM nous a permis de constater la présence des trois ions caractéristiques de l'Isoproturon (161,146,128) avec un temps de rétention ($Tr= 5,72$ min) dans l'échantillons d'eau issu de la zone agricole d'El-kaddous. Ceci est confirmé par l'injection de l'étalon pur dans les mêmes conditions d'analyse.

IV.6.Conclusion :

L'analyse par chromatographie gazeuse est une méthode très utilisée pour détecter toute trace de pesticide dans l'environnement. Couplée à un spectromètre de masse (GC/MS), elle offre la possibilité de confirmer la présence de ces polluants. L'utilisation du mode de sélection des ions offre dans ce cas une plus grande sensibilité (10 fois plus qu'en mode scan).

Cette partie nous a permis :

- de nous familiariser avec cette méthode et de connaître les différents mécanismes de fragmentation de l'Atrazine, Simazine et l'Isoproturon.
- d'analyser les échantillons d'eau issus de différentes zones agricoles : Ain-taya, Boufarik, Boudouaou, El-Kadous, Bench bane, Birtouta ainsi qu'une eau de la station d'épuration de Boudouaou.
- de confirmer la présence de la simazine dans l'échantillon d'eau en provenance de la zone agricole de Bench bane, et de l'Isoproturon dans les deux échantillons issus respectivement de Boufarik et d'El-Kadous.

La détection de ces herbicides vient de confirmer la sensibilité et la performance de la GC/MS dans le mode SIM par rapport à la HPLC/DAD seule.

Conclusion et Perspectives



Dans le but de protéger les cultures de diverses menaces pouvant altérer leurs qualités nutritives mais aussi les rendements agricoles, l'utilisation des produits phytosanitaires, entraîne souvent la contamination des différents compartiments de l'environnement (air, eau, sol), et rend nécessaire la surveillance des résidus dans l'environnement plus précisément dans l'eau. Ainsi et du fait de la faible teneur en résidus de pesticides autorisés par les différentes réglementations, des techniques analytiques permettant la détection de ces polluants à faible concentration sont nécessaires.

Dans ce mémoire, nous nous sommes intéressés à la mise en évidence des produits de protection des cultures telles que l'atrazine, la Simazine, l'Isoproturon, Propazine, le Terbutylazine, DIA, DEA, OHDIA, dans l'eau de drainage et dans les eaux d'épuration par des méthodes chromatographiques (HPLC/DAD, GC/MS).

Dans un premier temps, nous avons optimisé les conditions chromatographiques HPLC (nature et composition de la phase mobile) afin d'obtenir la meilleure séparation. Les conditions opératoires ainsi retenues sont :

- ❖ Colonne : Octadécyle C18 ;
- ❖ Phase mobile : Eau/ACN en mode gradient ;
T= 0 min 20% d'ACN pour atteindre 70 % en ACN à T = 55 min ;
- ❖ Débit 0.4 ml/min ;
- ❖ Longueur d'onde de détection : 220 nm.

Par la suite nous avons appliqué cette méthode à des échantillons d'eaux prélevés de différentes localités. Les analyses par HPLC/DAD ne nous ont pas permis de déceler une contamination par les pesticides recherchés.

Par ailleurs, nous avons recherché dans les mêmes extraits d'eau la présence de l'Atrazine, l'Isoproturon et la Simazine par la GC/MS qui présente une plus grande sensibilité. Les résultats obtenus révèlent une contamination des eaux de la zone agricole de Benchabane par la Simazine, mais aussi la présence de l'isoproturon dans les deux échantillons issus respectivement de la zone de Boufarik et celle d'El-Kadous.

En perspectives, cette étude nous à permis d'avoir une idée sur la chromatographie en général et les difficultés liés à l'extraction et l'analyse des pesticides.

-Il serait plus utile de compléter ce travail par l'utilisation d'autres techniques d'extraction telle que la SPME ou le Quechers.

- il serait intéressant aussi d'étudier la dépollution des eaux polluées par les pesticides par photocatalyse.

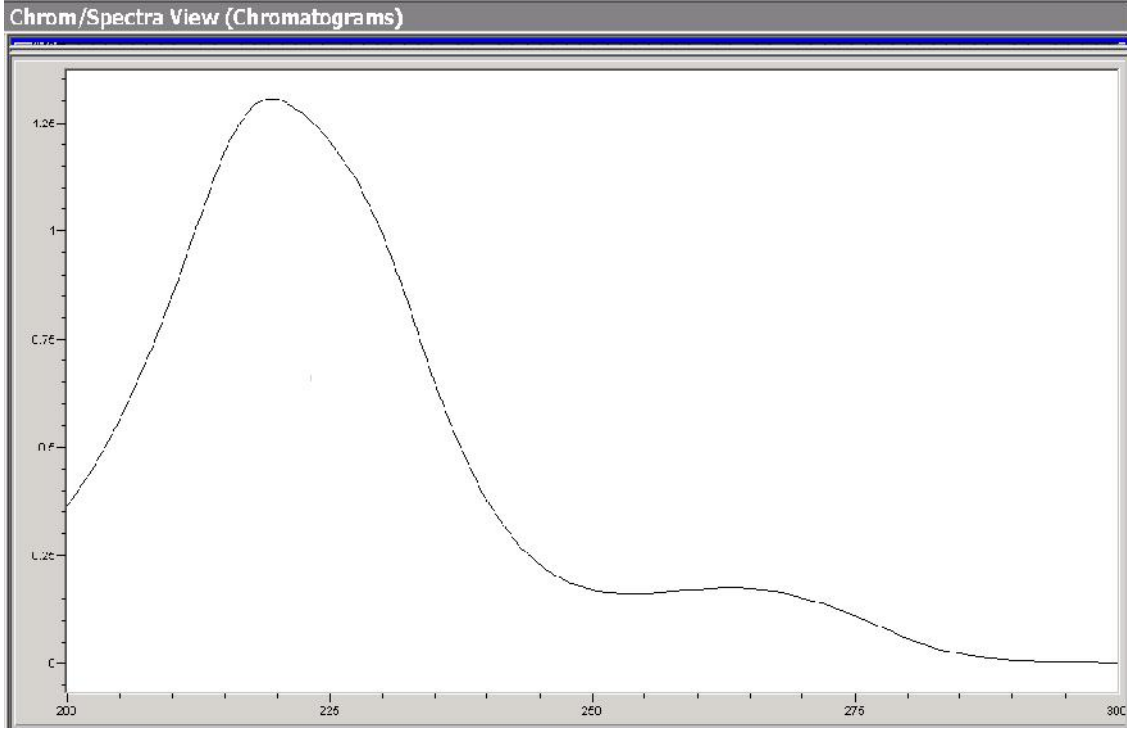
Annexe



Spectres UV des molécules étudiées

1-Atrazine :

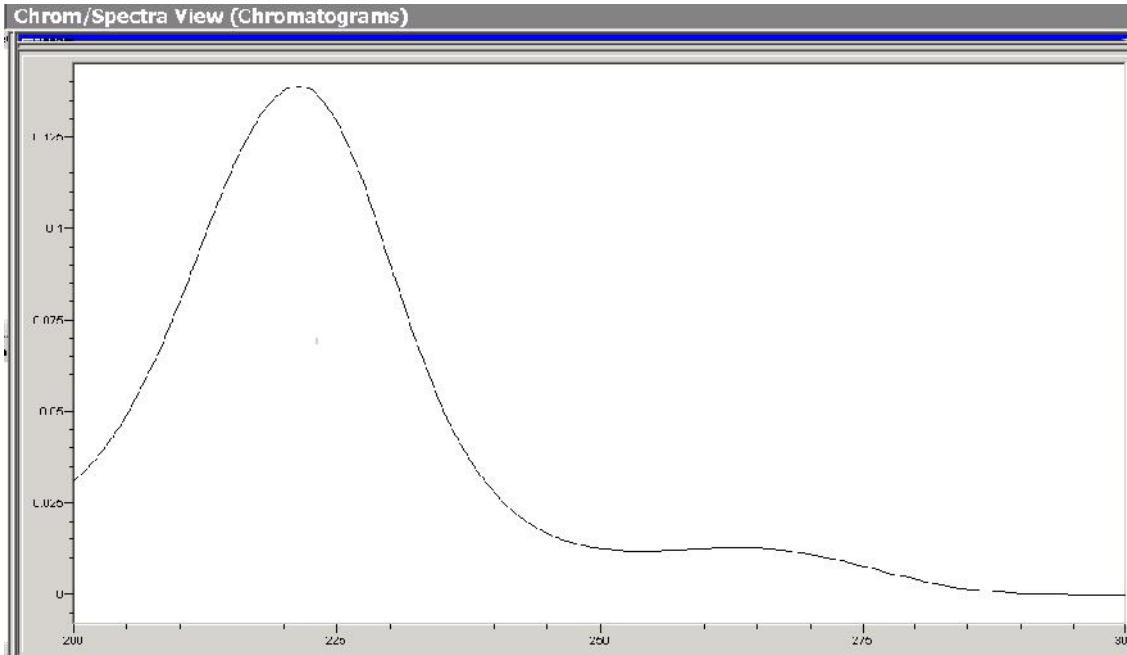
Absorbance



Longueur d'onde

2-Simazine :

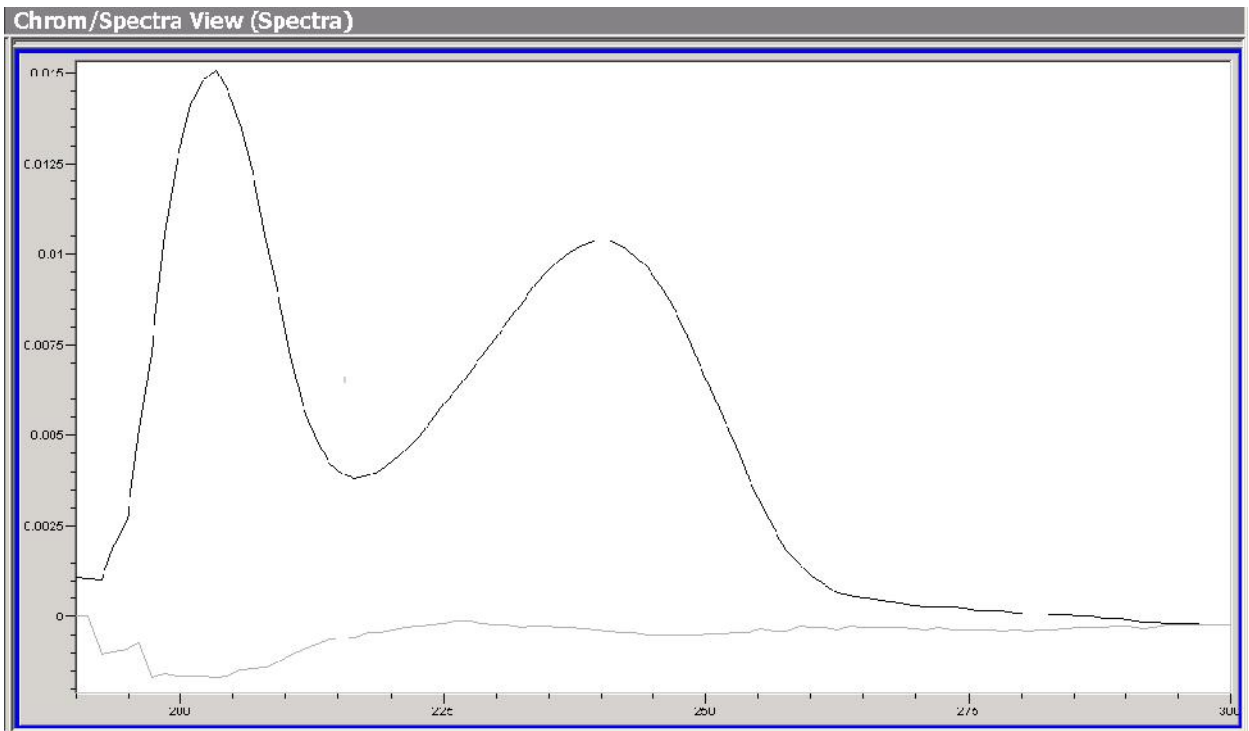
Absorbance



Longueur d'onde

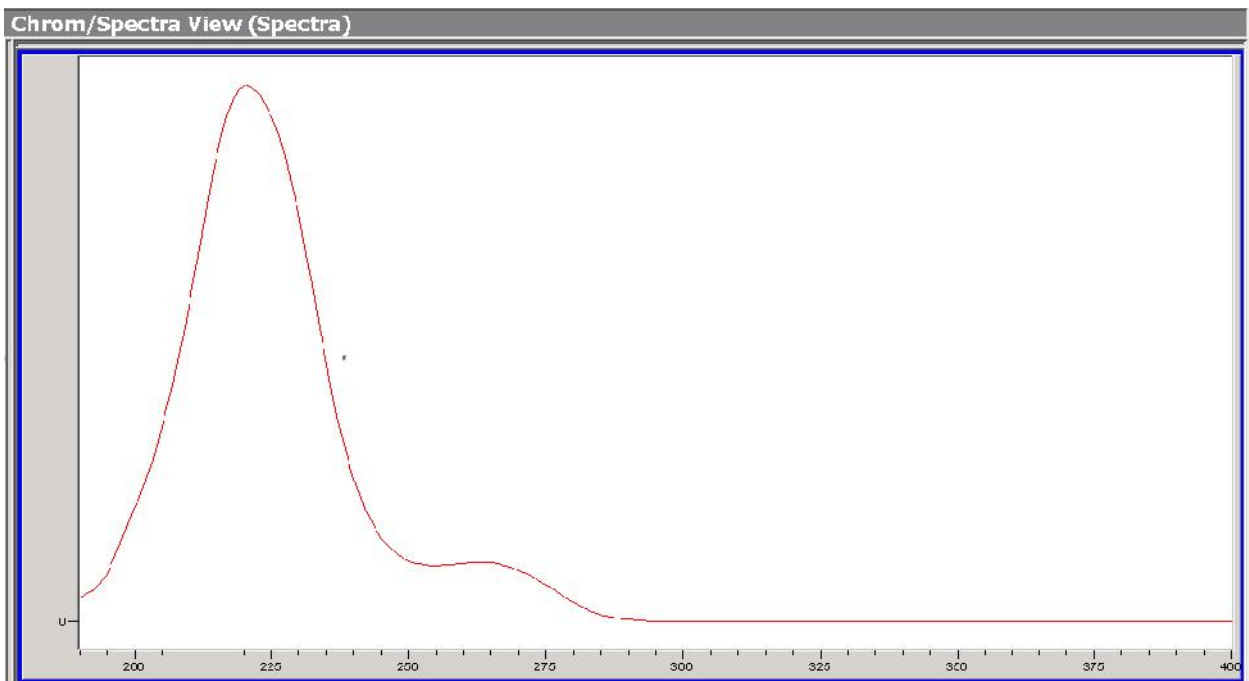
3-Isoproturon :

Absorbance



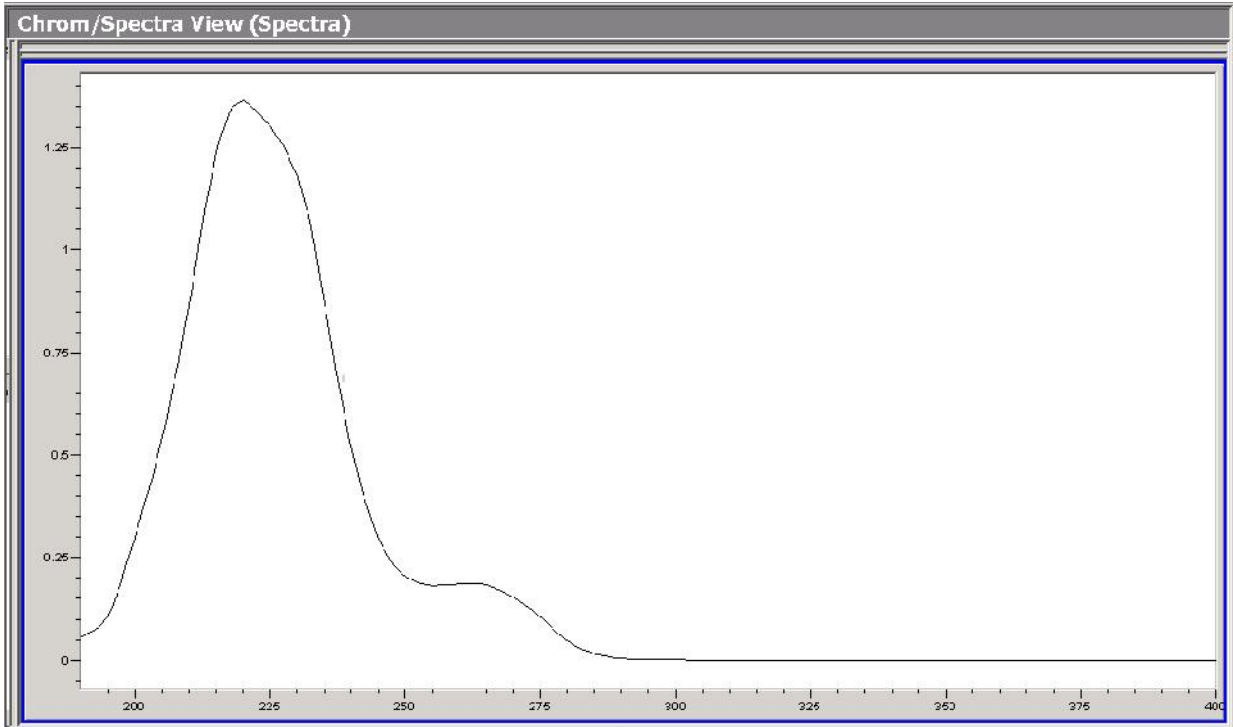
4-Propazine :

Absorbance



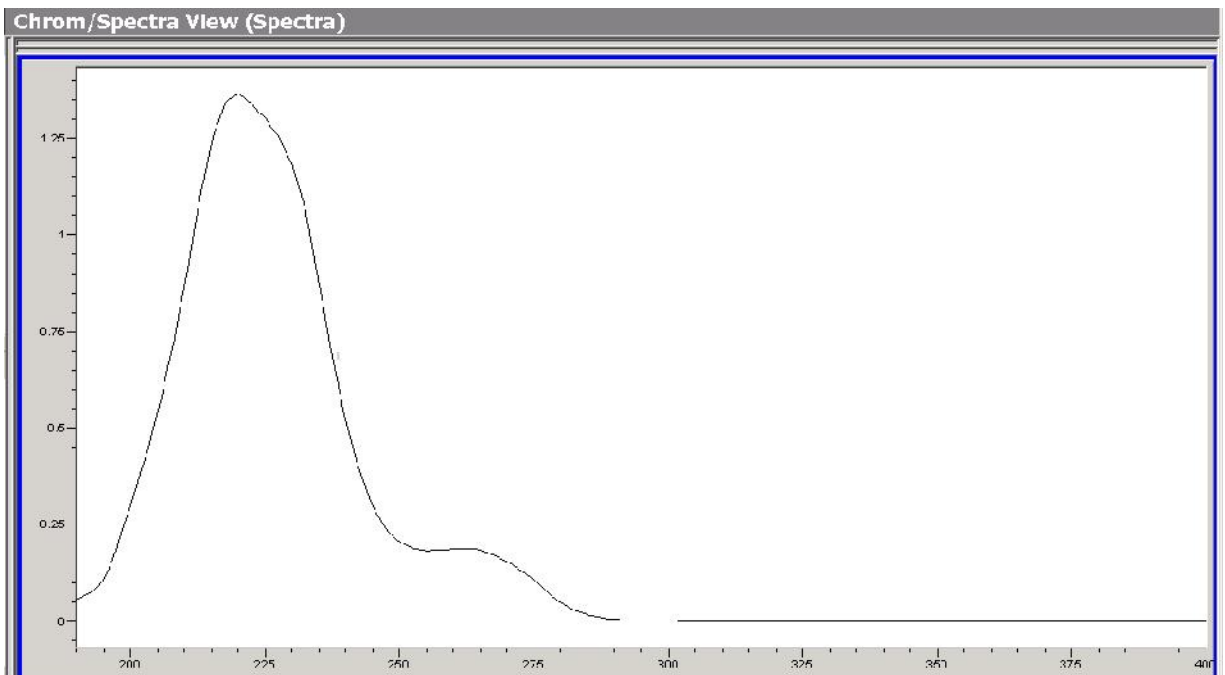
Longueur d'onde

5-Terbutylazine :



Longueur d'onde

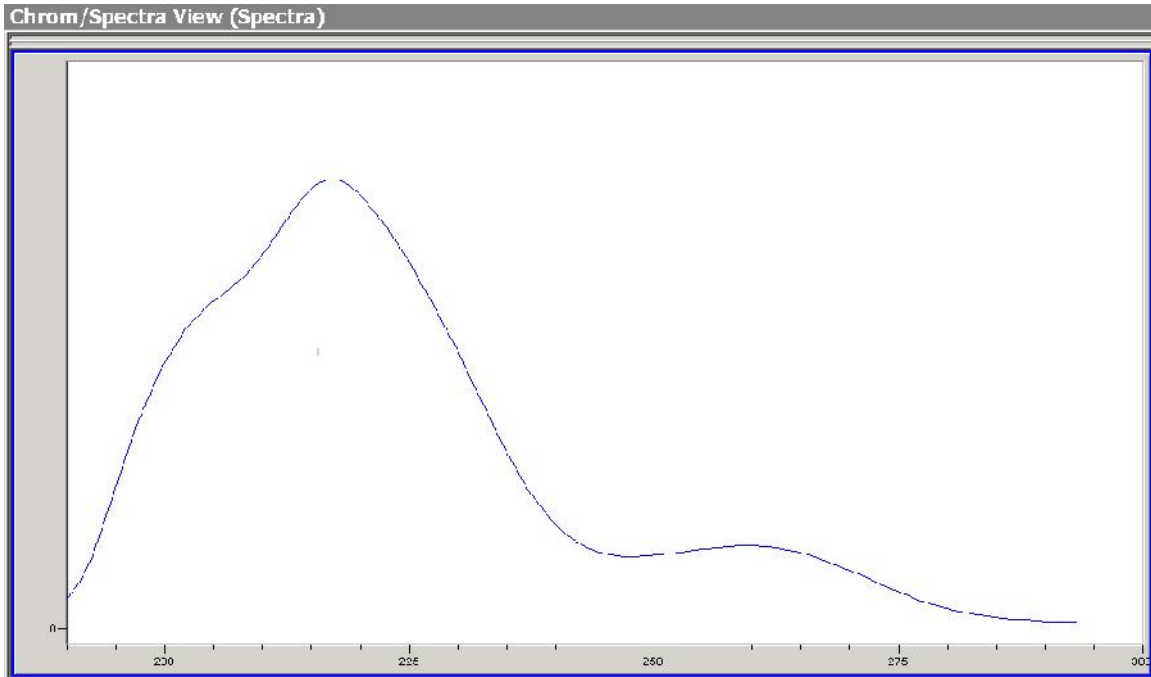
6-DDA



Longueur d'onde

7-DIA :

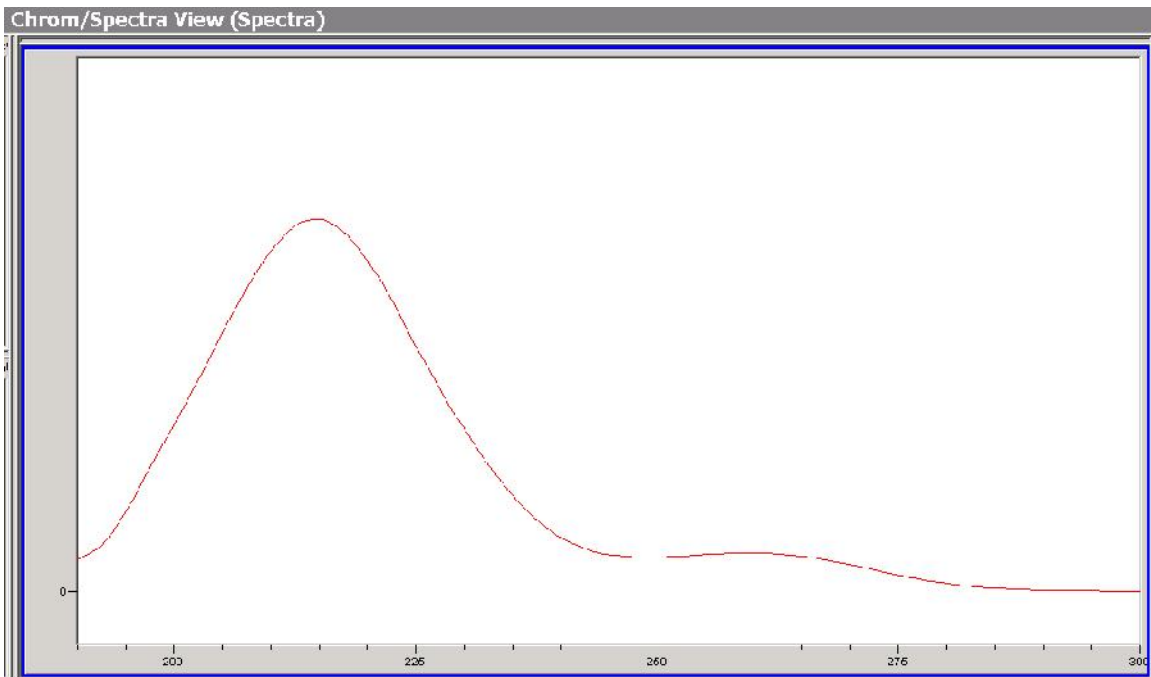
Absorbance



Longueur d'onde

8-DEA

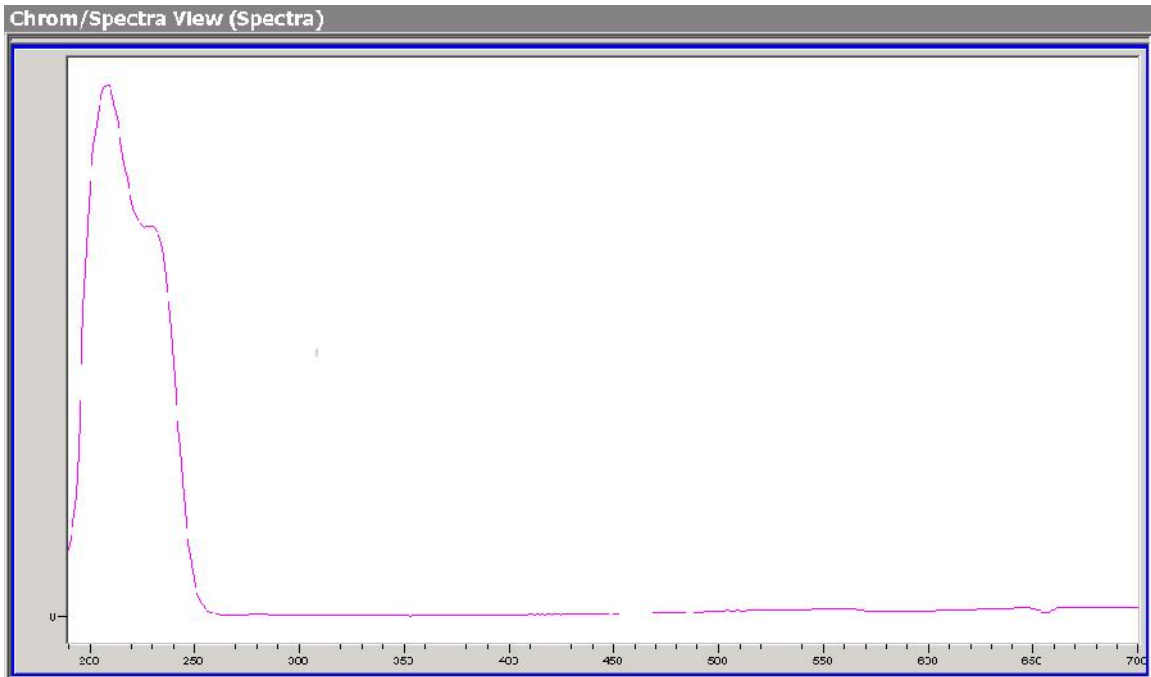
Absorbance



Longueur d'onde

9-OHDIA :

Absorbance



Longueur d'onde

Références bibliographiques

- [1] ORP, Observatoire des résidus de pesticide, site internet consulté en mars 2011 : <http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/>.
- [2] A. Garrido Frenich, J.L. Martinez Vidal, T. Lopez, S. Cortes Aguado, I. Martinez Salvador. *J.Chromatography A*, 1048. 199–206. **2004**.
- [3] R. Juraske, C.Mosquera vivas, A.Erazovel Velasquez, G.Binder . *Environ. Sci. Technol.* 45, 651–657, **2011**.
- [4] B.Jin. *Multirisidue determination of pesticide in lettuce, tomatoes and celery by gas chromatography, Chemical Ionisation/Ion Trap/ Mass spectrometry and liquid chromatographie/ Atmosphérique Pressure Chemical Ionisation /massspectrometry* .Doctor of philosophy gratuite program in food science. The sat University of New Jersey.**1999**.
- [5] R. K. Juhler and al. *Wat. Res.* 35, 6, 1371–1378, **2001**.
- [6] A.El- Arfaoui Benaomar. *Etude des processus d'adsorption et de désorption de produits phytosanitaires dans des sols calcaires*. Chimie de l'environnement. Thèse de doctorat, Université de Reims champagne-Ardenne , France. **2010**.
- [7] T.R.Steinheimer.. *J.Agric .food.chem.* 41,588-595. **1993**.
- [8] M. Clement, S. Arzel, B. Le Bot, R. Seux, M. Millet. *J.Chemosphere.* 40 ,49-56,**2000**.
- [9] C. Schummer , E.Mothiron , B. M.R. Appenzeller, A. Rizet ,R.Wennig , M. Millet. . *Environmental Pollution.* 158, 576-584. **2010**.
- [10] F.Aulagnier, L.Poissant, D.Brunet, C.Beauvais, M.Pilote, C.Deblois, N. Dassylva.. *Science of environment.* 394, 338-348, **2008**.
- [11] Kankou.M. *Vulnérabilité des eaux et des sols de la rive droite du fleuve Sénégal en Moritanie* .Thèse de doctorat ; Chimie et microbiologie de l'eau. Université de limoge, **2004**.
- [12] B. A. Tomkins, R. H. Ilgner. *Journal of Chromatography A*, 972 183–194, **2002**.
- [13] A.sheyer, S.Morville, P.Mirabel,M.Millet. *Bioanal chem.* , 384, 475-487, **2006**.
- [14] Index des phytosanitaire ACTA, Association de coordination technique agricole. **2006**.
- [15] Lars Neumeister. *Pesticide Action Handbook*. PAN Germany.Hamburg.**2003**.
- [16] M .F. Waxman *Agrochemical and safety handbook*.EDS.Lewiwi publishers, **1998**.
- [17]R.clavet et coll. *Les pesticides dans le sol conséquence agronomiques et environnementals*. France agricole.**2005**.
- [18] Gy.Matolcsy, M Nadasy, V.Andriska. *Pesticide chemistry*. **1988**.

- [19] J.Fournier, Chimie des pesticides. Cultures et technique. Agence de coopération culturelle et technique.**1988**.
- [20] J.Holland, P.sinclair. Denis Hamilton and Stephen Crossley. 28-58. **2004**.
- [21] V.Feigenburgel. Devenir Atmosphérique des pesticides .Thèse de doctorat d'Etat.Chimie physique.Université de strasbourg.**2005**.
- [22] C.M. Himel, H.Loats, G.W.Bailey. Pesticide sources to the soil and principles of sprays physics .H. CHENG ,2 :7-50.**1990**.
- [23] Yao Y., Harner T., Blanchard P., Tuduri L., Waite D., Poissant L., Murphy C., Belzer W.,Aulagnier F., Sverko E. Environ. Sci. Technol., 42, 5931-5937. **2008**.
- [24] M.Pfilger. Etude de la degradation photochimiques des pesticides adsorbés à la surface de particules atmosphérique. Thèse de Doctorat de l'Université de Provence.**2009**.
- [25] L.D Clendening. *A field mass balance study of pesticides volatilization,leachigand persistence*.Doctorat thesis.University of California riverside.**1988**.
- [26] Cs. Csutoras A. Kiss b.Microchemical Journal, 85, 21–24, **2007**.
- [27] F. J.Stevenson.rev.*Environnment*.1, 333-334.**1972**.
- [28] E.Evgnidou, F.Fytianos..J.Agricultural-Food chem, 50, 6423-6427. **2002**.
- [29] M.P.Charnay.Etude de la biodégradation des pesticides, rapport de l'INRA : dispositifs pour l'étude du comportement des pesticides dans l'environnement Montpellier, 93-98 disponible sur <http://www.inra.fr/Internet/Departements/EA/travaux/Barriuso.pdf>.
- [30]A.G.Hornsby,R.Don wauchop, A.Herner. pesticides properties in the environment.Springer.12-16,**1996**.
- [31] I.Sheunert, M.Mansour,U.Dorfler. The Science of The Total Environment, 132, Issues 2-3, pp: 361-369.**1993**.
- [32] Taoré S.K,et coll. Journal Africain des sciences de l'environnement, 1, 1-9.**2006**.
- [33]L. Swirsky Gold, H.Thomas, N.Bruce . *Pesticide Residues in Food and Cancer Risk: A Critical Analysis*. Handbook of Pesticide Toxicology, Second Edition (R. Krieger, ed.), San Diego, CA: Academic Press. 799-843 .**2001**.
- [34] H.I Morison, K.Wilkins, R.Semenciw, Y.mad, D.Wigle. *Herbicides and cancer*, *J.Natl.Cancer.inst* . 84, 1866-1874.**1992**.
- [35] A.Hercegova , Domotorova M, E. Matisova.J.chromatography.A.1153, 54-73, **2007**.
- [36]]H.I.Morison,K.wilkins,Y.Mao,D.wigle.Herbicides and cancer.INST,84,1866-1847,**1992**.
- [37] S.Osborn. Do pesticides cause lymphomas?lympomas foundation of America, **2000**.

- [38] P.K.Mills. Arch.Env.Heath, 53, 410-413, **1998**.
- [39] D.Garabrant and al. J.Natl.Cancer. 84,764-771, **1992**.
- [40] Ministère de l'agriculture et du développement durable. Recueil de Textes relatifs à la protection des végétaux. **2012**.
- [41] L.José .Tadeo. *Analysis of pesticides in food and environmental samples*. **37-56, 95-117**. Taylor and Francis Groupe. **2008**.
- [42] E.Top, D.gutzman, B.Bourgoin, J.Miixette. J Environ Toxicologie Chem, 14,743-747. **1995**.
- [43] A.Gong and al, J chromatographie A, 827, 57-63. **1998**.
- [44] C. Seanz and al. Microchim .Acta ,122, 267-277. **1996**.
- [45] R.kesari, VK Gupta. Talanta.47, 1085-1092. , **1998**.
- [46] C. creso ,Rm Marce,F Borrul. J.chromatography A, 670,135-144. **1994**.
- [47] C. Da Silva , E.De lima, F.Tavares. J.chromatography A,1014,109-116. **2003**.
- [48] E. turiel and al. J chromatography A, 961, 277-283. **2000**.
- [49] Anne scheyer . *Développement d'une méthode d'analyse par CPG/MS/MS de 27 pesticides identifiés dans les phases gazeuse, particulaire et liquide de l'atmosphère Application à l'étude des variation spatio-temporelles des concentrations dans l'air et dans les eaux de pluie*. Thèse Doctorat. Université de Strasbourg . **2004**.
- [50] Ch .Basheer and al. J.chromatogr A , 1087, 252-258. **2005**.
- [51] N. Sauret-Szczepanski, P Mirabel, H.Wortham. Environmental Pollution 139,133-142, **2006**.
- [52] E.H Damian. and al.. Analytica Chimica Acta 699 , 223– 231. **2011**.
- [53] R. Carabias-Martines , E.Rodriguez.Gonzalo, J.L.Pérez-Pavon, P.Paniagua-Marcos. J.Séparation science.24 (7).577-586. **2001**.
- [54] Zacco, E., Galve, R., Marco, M.P., Alegret, S., and Pividori, M.I.. Biosens. Bioelectron., 22(8), 1707–1715. **2007**.
- [55] R.L. Wixom, C.W. Gehrke, *Chromatography: A Science of Discovery*, John Wiley & Sons, Inc., USA, **2010**.
- [56] F.rouessac Analyse chimique. *Méthodes et techniques instrimentales modernes*. Dunod **2004**.

- [57] Y. Kazakevich, R. Lobrutto, *HPLC for Pharmaceutical Scientists*, John Wiley & Sons, Inc., USA, **2007**.
- [58] F. Roussac, A. Roussac, *Chemical Analysis modern instrumentation methods and techniques. 2*. John Wiley & Sons. England. **2007**.
- [59] M.S. Mills, E.M. Thurman., *Environ. Sci. Technol.* 28 (4). 600-605. **1994**.
- [60] S. Kern, K. Fenne, H. P. Singer, R. P. Schwarzenbach and J. Hollender. *Environ. Sci. Technol.* 43, 7039-7046, **2009**.
- [61] <http://toxnet.nlm.nih.gov/> Databases on toxicology, hazardous chemicals, environmental health, and toxic releases. United states library of medicine. Consulted on mars **2011**.
- [62] *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. John Wiley & Sons (2009).
- [63] S. Panshin, D.S. Carter, R.B. *Analysis of Atrazine and Four Degradation Products in the Pore Water of the Vadose Zone, Central Indiana*. *Environ. Sci. Technol.* 34, 2131-2137. **2000**.
- [64] E.A. Scribner, E.M. Thurman, L.R. Zimmerman. *The Science of the Total Environment* 248, 157-167. **2000**.
- [65] N. Papadopoulos, E. Gikas, G. Zalidis, A. Tsarboboulos. *J-Agr and Food chem.* 55, 7270-7277. **2007**.
- [67] V. Trajkovska, S. Petrovska-Jovanovi}, V. Pavlova. Adnan Menderes University, 4th AACD Congress, 29 Sept-3 Oct. **2004**, Ku adası-AYDIN/ TURKEY Proceedings Book 043.
- [68] H. Katsumata, S. Kaneco, T. Suzuki, K. Ohta. *Analytica Chimica Acta* 577, 214-219. **2006**.
- [69] Glaucia Maria F. Pinto*, Isabel Cristina S.F. *Journal of Chromatography A*, 869, 463-469. **2000**.
- [70] G. Currell. *Analytical techniques in the science*. University of the west of England at Bristol, UK. John Wiley & Sons. England. **2000**.
- [71] T. Crais and al *Rapid comm. Mass Spectrom.* 7, 71, **1993**.
- [72] Emilia Constantin, Piero Traldi, Donata Favretto, André Schnell, *Spectrométrie de masse, Principes et Application (2^{ème} édition)*. Technique et Documentation, **1996**.

- [73] V.Luccia Lanchote, P.Sueli Bonato, A.Luiz Cerdeira, N. Aparecida Guinain Santos, D. DE Cavalho, M.Antonio Comes. *Water air and soil pollution*. 118.329-337, **2000**.
- [74] S.Panshin, D.Carter E.randel ..*Environ.sci.technol* .34, 2131-2137.**2000**.
- [75] N.K.Vitanov , K .I.Lenova , I.Dobrev., 13,230-242.**2003**.
- [76] W.T. Ma, K.K.Fu, Zongwei Cai , G.B. Jiang. *J. Chemosphere* 52, 1632, **2003**.
- [77] H. Allemane, M. Prados-Ramirez, J. P. Croué et B. Legube . *Journal of Water Science*, 8, 315-331, **1995**.
- [78] K. Patel, R.J. Fussell, M. Hetmanski, D.M. Goodall, B.J. Keely. *J. Chromatogr. A*, 1068 289–296.**2005**.