

Développement d'un outil de traçabilité chimique MRC (Matériau de Référence Certifié) gammares pour la mise en œuvre de la surveillance chimique sur biote

**C. FALLOT, E. ALASONATI, J. CABILLIC, C. OSTER,
P. FISICARO et B. LALERE**
Avec la participation de O. GEFFARD et M. COQUERY

Septembre 2019

Document final

Contexte de programmation et de réalisation

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du programme scientifique et technique AQUAREF pour l'année 2017-2018, au titre de l'action « E » « Garantir la qualité des données bancarisées ».

Auteurs:

Béatrice LALERE
LNE
beatrice.lalere@lne.fr
Carine FALLOT
LNE
carine.fallot@lne.fr
Enrica ALASONATI
LNE
enrica.alasonati@lne.fr

Olivier GEFFARD
Irstea
olivier.geffard@irstea.fr

Caroline OSTER
LNE
caroline.oster@lne.fr
Julie CABILLIC
LNE

Paola FISICARO
LNE
paola.fisicaro@lne.fr

Marina COQUERY
Irstea
marina.coquery@irstea.fr

Vérification du document :
Aymeric DABRIN
Irstea
Aymeric.dabrin@irstea.fr

Approbateur ;
Sophie VASLIN-REIMANN
LNE
Sophie.vaslin-reimann@lne.fr

Les correspondants

AFB : Nicolas Gaury : nicolas.gaury@afbbiodiversite.fr
Olivier Perceval : olivier.perceval@afbbiodiversite.fr

LNE: Sophie Vaslin-Reimann : sophie.vaslin-reimann@lne.fr

Référence du document : B. Lalere et al. - Développement d'un outil de traçabilité chimique MRC (matériau de référence certifié) gammarets pour la mise en œuvre de la surveillance chimique sur biote – Rapport AQUAREF 2018 – 22 pages

Droits d'usage :	<i>Accès libre</i>
Couverture géographique :	<i>International</i>
Niveau géographique :	<i>National</i>
Niveau de lecture :	<i>Professionnels, experts</i>
Nature de la ressource :	<i>Document</i>

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION	7
2. ELEVAGE ET EXPOSITION DES GAMMARES	8
2.1 Choix de l'organisme cible	8
2.2 Origine et prélèvement des organismes utilisés	8
2.3 NQE Biote et facteur de bioaccumulation	8
2.4 Conditions d'exposition	9
2.5 Solutions de dopage	10
3. ESSAIS PRELIMINAIRES	10
3.1 Préparation des matériaux	10
3.2 Résultats des analyses du mercure total	11
3.2.1 Méthodes de traitement des échantillons et d'analyse	11
3.2.2 Résultats	12
3.3 Résultats des analyses pour les composés organiques HAP et PBDE	13
3.3.1 Méthodes de traitement des échantillons et d'analyse	13
3.3.2 résultats	14
3.4 Conclusions de l'étude préliminaire	15
4. ETUDE CINETIQUE	15
4.1 Préparation des matériaux	15
4.2 Résultats des essais de cinétique : HAP et PBDE	18
4.3 Résultats des essais de cinétique : Hg	17
4.4 Conclusions des études cinétiques	19
5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	19
6. BIBLIOGRAPHIE	20

Liste des annexes :

Annexe 1: Méthode d'analyse des HAP et des PBDE	21
--	-----------

DEVELOPPEMENT D'UN OUTIL DE TRAÇABILITE CHIMIQUE MRC (MATERIAUX DE REFERENCE CERTIFIES) GAMMARES POUR LA MISE EN ŒUVRE DE LA SURVEILLANCE CHIMIQUE SUR BIOTE
B. LALERE C. FALLOT, E. ALASONATI, J. CABILLIC, C. OSTER, P. FISICARO, O. GEFFARD et M. COQUERY

RESUME

L'évaluation des performances des méthodes analytiques et de leur validation sont essentielles pour permettre aux laboratoires de produire des données analytiques fiables.

Deux voies principales sont possibles pour évaluer les performances d'une méthode :

- l'utilisation des matériaux de référence (certifiés) MRC à matrice c'est-à-dire représentatifs des échantillons analysés par le laboratoire;
- la participation à des comparaisons interlaboratoires (CIL) avec assignation de la valeur de référence.

La matrice biote représente une alternative pertinente pour le suivi de nombreux contaminants. Cependant, à la suite de la révision de la Directive 2013/39/CE, de sa transposition en droit français et de sa mise en application dans les programmes de surveillance, sa mise en œuvre opérationnelle est apparue comme un enjeu prioritaire au regard des nombreuses questions méthodologiques et techniques qu'elle amène. Pour chaque substance ou famille de substances, la directive fixe une norme de qualité environnementale (NQE) sur un biote pertinent (poisson entier ou filet, mollusques, crustacés). Cependant, chaque Etat Membre peut dériver une NQE sur un biote alternatif. La stratégie nationale envisagée inclut notamment une surveillance sur le gammare encagé. Dans le cadre des travaux du thème E du cycle précédent (2013-2015) sur les inventaires MRC et CIL disponibles, il a été mis en évidence l'absence d'outils pour permettre aux laboratoires de valider leurs méthodes sur ces matrices et aux évaluateurs d'exercer une appréciation objective.

Devant ce manque, AQUAREF a conduit une étude de faisabilité d'un matériau de référence de gammares pour certaines des substances pour lesquelles des NQE biote sont disponibles :

- le mercure (Hg)
- les HAP (Benzo-a-pyrène (BaP) et Fluoranthène)
- les PBDE (PBDE 28, PBDE 47, PBDE 99, PBDE 100, PBDE 153, PBDE 154).

Les résultats de cette étude ont permis de fixer des conditions expérimentales et opératoires pour la production d'un MR gammare pour une future CIL :

- Une exposition sur 5 jours pour être au plus près des paliers de bioaccumulation (HAP et PBDE) tout en minimisant le temps d'exposition étant donné que les organismes ne sont pas alimentés et donc limiter le taux de mortalité (et ainsi également maintenir une bonne homogénéité et reproductibilité).
- Afin de limiter les risques de contamination, il a été décidé de ne pas broyer les échantillons.
- L'analyse pour le mercure sera réalisée sur des échantillons congelés et non broyés, alors que pour l'analyse des composés organiques (HAP et PBDE) les échantillons seront lyophilisés et non broyés.

Mots clés (thématique et géographique) :

Surveillance, matrice biote, matériau de référence, gammares, mercure, HAP, PBDE

DEVELOPMENT OF A CHEMICAL TRACEABILITY TOOL AS GAMMARUS CRM (CERTIFIED REFERENCE MATERIALS) IN SUPPORT OF THE IMPLEMENTATION OF CHEMICAL SURVEILLANCE ON BIOTA

B. LALERE C. FALLOT, E. ALASONATI, J. CABILLIC, C. OSTER, P. FISICARO, O. GEFFARD et M. COQUERY

ABSTRACT

Evaluating the performance of analytical methods and their validation is essential to enable laboratories to produce reliable analytical data.

There are two main ways to evaluate the performance of a method:

- the use of matrix matched (certified) reference material CRM that is to say representative of the samples analyzed by the laboratory;
- the participation to interlaboratories comparisons (ILC) with assignment of the reference value.

The biota matrix represents a relevant alternative for the monitoring of many contaminants. However, following the revision of Directive 2013/39 / EC, its transposition into French law and its implementation in monitoring programs, its operational implementation has emerged as a priority issue in view of the many methodological and technical issues it brings. For each substance or family of substances, the directive sets an environmental quality standard (EQS) for a relevant biota (whole fish or fillet, molluscs, crustaceans). However, each Member State can derive an EQS on an alternative biota. The envisaged national strategy includes monitoring of the gammarus caged. As part of the work of theme E of the previous cycle (2013-2015) on available CRM and ILC inventories, it was highlighted the lack of tools to enable laboratories to validate their methods on these matrices and also to allow an objective assessment by assessors.

Faced with this lack, AQUAREF has conducted a feasibility study of a gammarus reference material for some of the substances for which biota EQS are available:

- ☐ Mercury (Hg)
- ☐ PAHs (Benzo-a-pyrene (BaP) and Fluoranthene)
- ☐ PBDEs (PBDE 28, PBDE 47, PBDE 99, PBDE 100, PBDE 153, PBDE 154).

The results of this study made it possible to set experimental and operative conditions for the production of a gammarus material for a future ILC:

- A 5-day exposure to be closer to bioaccumulation levels (PAHs and PBDEs) while minimizing the exposure time since organisms are not fed and therefore limit the mortality rate (and thus also maintain a good homogeneity and reproducibility).
- To limit the risk of contamination, it was decided not to grind the samples.
- The analysis for mercury will be performed on frozen and unmilled samples, while for the analysis of organic compounds (PAHs and PBDEs) the samples will be freeze-dried and not milled.

Key words (thematic and geographical area):

Monitoring, biota matrix, reference material, gammarus, mercury, PAH, PBDE

1. INTRODUCTION

L'évaluation des performances des méthodes analytiques et de leur validation sont essentielles pour permettre aux laboratoires de produire des données analytiques fiables. Deux voies principales sont possibles pour évaluer les performances d'une méthode :

- l'utilisation des matériaux de référence (certifiés) à matrice c'est-à-dire représentatifs des échantillons analysés par le laboratoire ;
- la participation à des comparaisons interlaboratoires (CIL) avec assignation de valeur de référence.

A la suite de la révision de la Directive cadre européenne sur l'eau (DCE) en ce qui concerne les substances prioritaires (2008/105/CE et 2013/39/CE), de sa transposition en droit français et de sa mise en application dans les programmes de surveillance, la matrice biote est apparue comme un enjeu prioritaire au regard des nombreuses questions méthodologiques et techniques qu'elle amène. Pour chaque substance ou famille de substances ciblées (substances organiques prioritaires hydrophobes et mercure), la nouvelle directive fixe une norme de qualité environnementale (NQE) sur un biote pertinent (poisson entier ou filet, mollusques, crustacés). Cependant, chaque Etat Membre peut dériver une NQE sur un biote alternatif. La stratégie nationale inclut une surveillance sur le gammare encagé. Dans le cadre des travaux précédents d'AQUAREF sur les inventaires des matériaux de référence certifiés (MRC) et comparaisons Interlaboratoires (CIL), en particulier les Essais d'Aptitude, disponibles, il a été mis en évidence l'absence d'outils pour permettre aux laboratoires de valider leurs méthodes sur ces matrices et aux évaluateurs d'exercer une appréciation objective.

En réponse à ce besoin, AQUAREF a conduit une étude de faisabilité d'un matériau de référence de gammares pour 3 classes de substances pour lesquelles des NQE biote sont disponibles:

- le mercure (Hg),
- les Hydrocarbures aromatiques polycycliques HAP : Benzo-a-pyrène (BaP) et Fluoranthène
- les PBDE : PBDE 28, PBDE 47, PBDE 99, PBDE 100, PBDE 153, PBDE 154.

Afin de garantir une très grande représentativité du matériau développé le choix de mettre en œuvre et d'optimiser des conditions d'expérimentation permettant de disposer d'un matériau contaminé dans les niveaux de concentrations se rapprochant des NQE fixées par la réglementation a été formulé.

En conséquence, cette étude s'est déroulée en trois étapes :

- 2017 : Essais préliminaires afin de limiter les étapes de préparation qui peuvent être source de contamination et/ou de perte ;
- 2018 : Expérimentations en conditions contrôlées pour décrire les cinétiques de bioaccumulation chez le gammare pour les substances visées dans l'étude.
- 2019 : Homogénéité et stabilité du MR gammares afin de fournir à des laboratoires experts ce matériau pour une CIL. Cette partie fera l'objet d'un rapport ultérieur.

Les expérimentations d'exposition ont été réalisées à Irstea. Le LNE a préparé les solutions de dopage et a réalisé les extractions et les analyses des contaminants dans les gammares.

2. ELEVAGE ET EXPOSITION DES GAMMARES

2.1 CHOIX DE L'ORGANISME CIBLE

Le choix s'est porté sur *Gammarus fossarum* qui est une espèce jouant un rôle très important dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques. Cette espèce est connue pour être un accumulateur des substances chimiques, métalliques et organiques, ce qui en fait une espèce sentinelle en écotoxicologie (Geffard et al. 2014, Recoura-Massaquant et al. 2014).

Cet organisme est proposé pour la surveillance chimique dans le cadre de la DCE au travers d'un rapport technique européen (Guide 32 : 2014), notamment via leur encagement selon un protocole précis qui a récemment fait l'objet d'une norme publiée (XP T 90-721, AFNOR 2019).

2.2 ORIGINE ET PRELEVEMENT DES ORGANISMES UTILISES

Les gammares utilisés dans ce travail proviennent de la population source et contrôle utilisée par la société Biomae. Cette population se trouve située sur une ancienne cressonnière dans l'Ain, alimentée par une rivière appelée le Pollon, un affluent de la rivière Ain. Les gammares ont été prélevés à l'aide d'un filet de type troubleau et tamisés sur place pour ne récupérer que ceux retenus entre les tamis d'ouverture de maille de 2,0 et 2,5 mm. Ils ont ensuite été rapidement transportés au laboratoire à l'aide de glacières, puis maintenus en stabulation pendant 1 semaine dans des aquariums de 30L, sous aération constante, dans une eau maintenue à une température de $12\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ et une photopériode de 16h de jour/8h de nuit. Les gammares ont été nourris à l'aide de feuilles d'aulne (*Alnus glutinosa*) récoltées sur un site non anthropisé dans le Beaujolais. Deux fois dans la semaine, les organismes ont reçu des vers lyophilisés de *Tubifex sp* comme supplément protéique.

2.3 NQE BIOTE ET FACTEUR DE BIOACCUMULATION

L'objectif de l'expérimentation a été de se rapprocher des NQE définies sur le biote pour définir la concentration ciblée dans les échantillons du candidat MRC gammares (Tableau 1).

Tableau 1 : NQE dans le biote (Directive 2013/39/CE)

	NQE biote (μg de composé/kg en poids humide)
PBDE 28, PBDE 47, PBDE 99, PBDE 100, PBDE 153, PBDE 154	0,0085
Benzo(a)Pyrène	5
Fluoranthène	30
Mercure	20

Les gammares sont contaminés par les composés contenus dans l'eau de l'aquarium. Le facteur de bioaccumulation (BCF) (Tableau 2) permet d'établir une relation entre la concentration de l'eau et celle mesurée dans le biote, à l'équilibre, selon l'équation suivante :

$$BCF \left(\frac{L}{Kg} \right) = \frac{\text{Concentration mesurée dans le biote} \left(\frac{\mu g}{kg} \right)}{\text{Concentration dans l'eau} \left(\frac{\mu g}{L} \right)}$$

Tableau 2 : Facteurs de bioaccumulation considérés pour construire la démarche expérimentale

	Biote	BCF (L/kg)
PBDE 28, PBDE 47, PBDE 99, PBDE 100, PBDE 153, PBDE 154 [1]	Poisson	35100 (Pire cas)
Benzo(a)Pyrène [2]	Crustacés - valeur maximale	12 800
Fluoranthène [2]	Daphnia magna - crustacé -	1 740
Mercure [2]	Mollusques	5 300

[1] PolyBDEs EQS dossier 2011 EQS dossier was prepared by the Sub-Group on Review of the Priority Substances List (under Working Group E of the Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive, disponible sur circabc.europa.eu

[2] Portail des substances chimiques Ineris <https://substances.ineris.fr/fr/homepage/search>)

Ces valeurs de BCF indicatives ont été utilisées pour définir les niveaux d'exposition des gammares (2.4)

2.4 CONDITIONS D'EXPOSITION

Les gammares utilisés pour ce travail sont des individus uniquement mâles et de taille homogène (poids compris entre 20 à 25 mg).

L'exposition des gammares aux contaminants (Hg, PBDE et HAP) a été réalisée via la voie dissoute. L'eau utilisée est celle disponible au laboratoire d'écotoxicologie Irstea et utilisée pour la stabulation. Il s'agit d'une eau naturelle obtenue à l'aide d'un forage présent à Irstea. Les systèmes d'expositions sont différents selon les classes de substances ciblées :

Pour le Hg : béciers polypropylène de 500mL avec 25 gammares par bécier. La contamination des milieux a été réalisée à partir de solutions mères préparées en eaux acidifiées avec de l'acide nitrique (0,5% (v/v) pour garantir la stabilité du mercure sans dépasser un volume de dopage de 200µL de solution de dopage par bécier.

Pour les HAP et PBDE : flacons en verre de 5 litres, avec 240 individus par flacon. La contamination des milieux a été réalisée à partir de solutions en solvant organique (acétone) sans dépasser un rapport 1/20 000ème dans le système d'expérimentation.

L'ensemble des expositions a été réalisé à l'obscurité et les milieux contaminés ont été renouvelés deux fois par jour afin de maintenir des conditions d'exposition constantes. Aucune alimentation n'a été fournie aux gammares au cours de l'exposition.

2.5 SOLUTIONS DE DOPAGE

Les solutions permettant de doper l'eau des béchers ou flacons, appelées dans la suite du document « solutions de dopage », ont été préparées par le LNE :

- Pour les HAP et PBDE, les solutions de dopage ont été préparées dans l'acétone, solvant compatible avec les composés mais dont la concentration doit être ajustée selon le volume du système d'exposition, la concentration cible et le rapport eau acidifié/eau max dans le système d'exposition
- Pour le mercure, les solutions ont été préparées dans de l'eau déminéralisée acidifiée avec de l'acide nitrique (0,5% (v/v) pour la stabilité du mercure), mais dont la concentration doit être ajustée selon le volume du système d'exposition, la concentration cible et le rapport solvant/eau max dans le système d'exposition.

Les conditions ciblées dans les différentes expositions sont précisées dans les paragraphes spécifiques ci-après.

3. ESSAIS PRELIMINAIRES

L'objectif est de définir sous quelle forme le matériau doit être distribué aux utilisateurs (congelé, lyophilisé, broyé...). Pour limiter les étapes de préparation du matériau qui sont sources de contamination et/ou de perte, un plan d'expérience a été réalisé pour tester les effets du broyage et de la lyophilisation.

Le plan d'expériences suivant a été mis en œuvre :

- 1) Echantillon lyophilisé et broyé
- 2) Echantillon lyophilisé et non broyé
- 3) Echantillon broyé
- 4) Echantillon non broyé

Quelles que soient les conditions testées, les matériaux ont subi une étape de congélation immédiatement après échantillonnage. Afin de garantir la robustesse des conclusions, 4 réplicats ont été réalisés par condition testée et des contrôles (gammares non exposés, MRC) ont été ajoutés.

3.1 PREPARATION DES MATERIAUX

Les matériaux contaminés ont été produits par IRSTEa au mois d'août 2017. Les gammares ont été exposés pendant 4 jours aux concentrations suivantes dans l'eau (avec un renouvellement de l'eau contaminée deux fois par jour) et avec des valeurs cibles supérieures aux NQE biote (Tableau 3) :

- Lot de gammares contaminés au Hg : 100 ng(Hg)/L
- Lot de gammares contaminés aux HAP et PBDE :
 - BaP = 4 ng/L
 - Fluo = 180 ng/L
 - PBDE = 0,4 ng/L

Tableau 3 : Valeurs cibles dans le gammare et comparaison aux NQE_{biote}

	Valeur cible biote (µg de composé/kg poids humide)	Rapport Valeur cible biote / NQE _{biote}
PBDE 28, PBDE 47, PBDE 99, PBDE 100 PBDE 153, PBDE 154	14	1652
BaP	48	10
Fluo	313	10
Hg	530	27

Pour le mercure, un lot contient 10 gammares alors que pour les composés organiques, un lot est constitué de 60 gammares.

Après les 4 jours d'exposition, l'ensemble des matériaux échantillons ont été congelés et envoyés au LNE (Tableau 4).

Tableau 4 : Matériaux gammares préparés pour analyse (4 réplicats d'exposition par type de traitement)

	Poids (mg frais)				Nombre			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Gammare pour la manip LNE								
Témoin organique	1363.0	1376.0	1326.6	1035.6	60	60	60	48
Témoin Hg	255.1	242.6	230.4	238.7	10	10	10	10
Gammare organiques lyo et broyés	1395.7	1402.6	1306.9	1347.8	60	60	60	60
Gammare organiques lyo et non broyés	1368.2	1395.2	1346.7	1372.8	60	60	60	60
Gammare organiques congelés et broyés	1314.5	1388.7	1338.0	1343.0	60	60	60	60
Gammare organiques congelés et non broyés	1188.9	1102.3	1171.4	412.2	50	50	50	18
Gammare Hg lyo et broyés	248.5	210.5	210.4	247.4	10	10	10	10
Gammare Hg lyo et non broyés	237.9	222.5	243.5	229.8	10	10	10	10
Gammare Hg congelés et broyés	243.1	236.4	232.1	240.8	10	10	10	10
Gammare Hg congelés et non broyés	243.2	236.5	251.3	226.2	10	10	10	10

La préparation des échantillons et les analyses ont été effectuées au LNE pendant les mois de septembre-octobre 2017.

3.2 RESULTATS DES ANALYSES DU MERCURE TOTAL

3.2.1 METHODES DE TRAITEMENT DES ECHANTILLONS ET D'ANALYSE

La préparation des échantillons, lyophilisation et/ou broyage, a été réalisée de la manière suivante :

- **Lyophilisation** : les échantillons ont été transférés dans des tubes en polypropylène de 50 mL et pesés pour évaluer le pourcentage d'humidité (% humidité). Ils ont été ensuite lyophilisés pendant 2,5 jours.
 - o Lyophilisés/non-broyés : le matériel est transféré dans des godets de minéralisation, pesé, puis 3 mL d'acide nitrique, 0,5 mL d'eau oxygénée et 3 mL d'eau ultra pure sont ajoutés.

- Lyophilisés/broyés : le matériel est broyé avec une tige en verre directement dans les tubes utilisés pour la lyophilisation, pesé, puis transféré dans les godets de minéralisation à l'aide des solutions de minéralisation (3 mL d'acide nitrique, 0,5 mL d'eau oxygénée et 3 mL d'eau ultra pure).
- **Broyage du produit congelé** : deux des quatre réplicats et le témoin ont été broyés en utilisant un mortier en agate. Le produit broyé a ensuite été transféré dans le godet de minéralisation, pesé, puis 3 mL d'acide nitrique, 0,5 mL d'eau oxygénée et 3 mL d'eau ultra pure ont été ajoutés. Les deux autres réplicats ont été broyés directement dans le godet de minéralisation à l'aide du pilon en agate, avant l'ajout des solutions de minéralisation.
- **Analyse directe du produit congelé** : les matériaux ont été transférés dans les godets de minéralisation, pesés, ensuite les solutions de minéralisation ont été ajoutés (3 mL d'acide nitrique, 0,5 mL d'eau oxygénée et 3 mL d'eau ultra pure).

L'analyse des échantillons a été réalisée de la manière suivante :

La minéralisation se fait par digestion au four micro-onde (Ethos One, Milestone). Ensuite les échantillons sont récupérés dans les tubes d'analyse en utilisant 50 mL d'eau ultra pure. Les échantillons sont ensuite analysés par ICP-MS à secteur magnétique (ELEMENT XR, Thermo Scientific).

Pour chaque type de préparation, un témoin a été réalisé en parallèle ainsi qu'un blanc analytique. Aucune contamination des blancs n'a été mise en évidence. La limite de Quantification (LOQ) de la méthode peut s'estimer au tour de 5 ng(Hg) /g gammare - poids humide (LOQ instrumentale ~20 ng(Hg)/L).

3.2.2 RESULTATS

Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative sur le dosage du mercure total, lorsqu'on applique les quatre méthodes différentes de préparation des gammars (Tableau 5, Figure 1).

Un problème de contamination a été observé dans l'approche "broyé". Les échantillons traités avec le mortier ont été contaminé en mercure : ces données ont été exclues de la valeur moyenne pour la méthode « broyé ». La quantité de mercure dosé dans le témoin contaminé est reportée dans le Tableau 5 et en Figure 1. Si on exclut le témoin contaminé, la teneur de mercure dans les témoins est très homogène, de l'ordre de 7-8 ng/g de poids humide.

La méthode la plus rapide et qui expose moins les échantillons au risque de contamination est la **minéralisation directe du produit congelé**. Cette méthode est donc retenue pour la suite de l'étude.

Après 4 jours d'exposition on dose en moyenne **44 ng(Hg)/g gammares (poids humide)**. Sur la base d'un facteur de bioaccumulation pour le mercure, $BCF(Hg) = 5000$, une concentration de 500 ng(Hg)/g (poids humide) gammares était attendue : la valeur mesurée est 10 fois inférieure.

Tableau 5 : Résultats des tests pour évaluer l'effet de la méthode de préparation sur le Hg total (ng(Hg)/g gammares en poids humide) : moyenne et écart-type de 4 réplicats par condition. Un témoin pour chaque méthode a été analysé.

	Lyo+Non Broyé	Lyo NB - Tém	Lyo+Broyé	Lyo B - Tém	Non Broyé	NB - Tém	Broyé	B - Tém	Tous
Moyenne	43	7	44	7	43	8	46	187	44
Ecart-type	2	-	2	-	2	-	1	-	2
RSD%	5	-	5	-	4	-	2	-	5

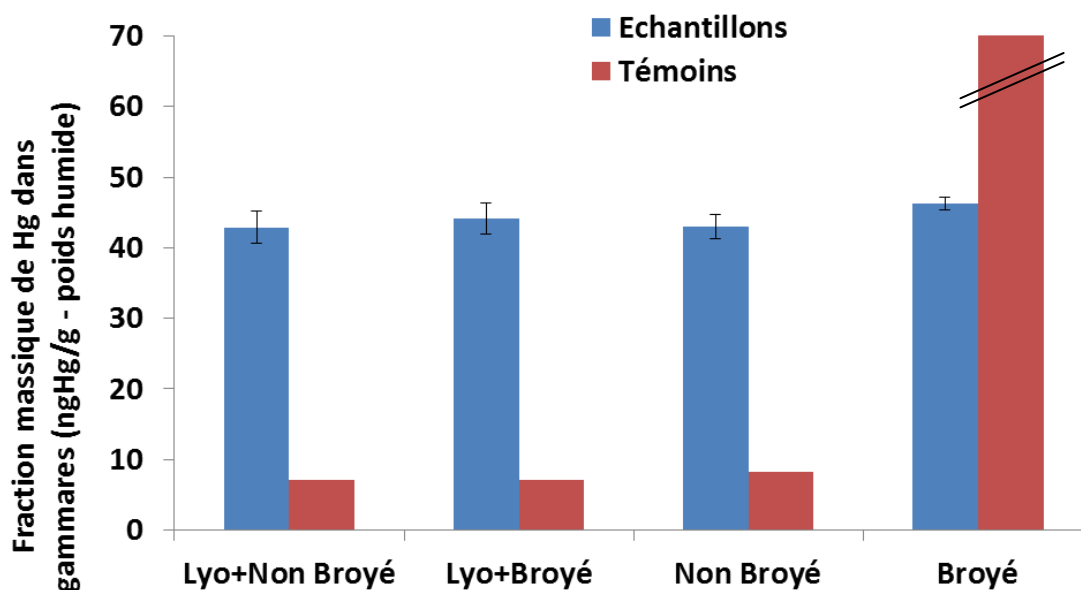


Figure 1 : Impact de la méthode de préparation des gammares sur le dosage du mercure total.

3.3 RESULTATS DES ANALYSES POUR LES COMPOSES ORGANIQUES HAP ET PBDE

3.3.1 METHODES DE TRAITEMENT DES ECHANTILLONS ET D'ANALYSE

La préparation des échantillons, lyophilisation et/ou broyage, a été réalisée dans les flacons d'origine :

- Pour la lyophilisation : les échantillons ont été lyophilisés pendant 2,5 jours.
- Pour le broyage : les échantillons ont été broyés avec un pilon en Agathe dans leur flacon d'origine.

Les échantillons ont ensuite été transvasés dans des cellules d'extraction ASE® et extraits par extraction par solvant chaud pressurisé (ASE). Les échantillons ont ensuite

été évaporés à sec puis repris dans 500 μL d'acétonitrile et purifiés selon le protocole décrit en Annexe1. Après la purification, ils ont de nouveau été évaporés à sec puis repris dans 200 μL d'isooctane et analysés par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC/MS) (cf. Annexe 1).

Pour chaque type de préparation, un témoin a été réalisé en parallèle ainsi qu'un blanc analytique. Aucune contamination des témoins et des blancs n'a été mise en évidence.

3.3.2 RESULTATS

Les résultats obtenus sont présentés en Figure 2. La figure représente la moyenne des concentrations mesurées en $\mu\text{g/kg}$ de poids humide et la dispersion associée (2 fois l'écart type).

La lyophilisation semble être la méthode la plus adaptée pour assurer par la suite une bonne extraction des composés organiques. Les résultats obtenus pour les échantillons lyophilisés avec et sans broyage ne sont pas statistiquement différents. Par contre, pour la congélation seule, il semble que le broyage soit indispensable pour assurer une bonne efficacité de l'extraction des composés organiques.

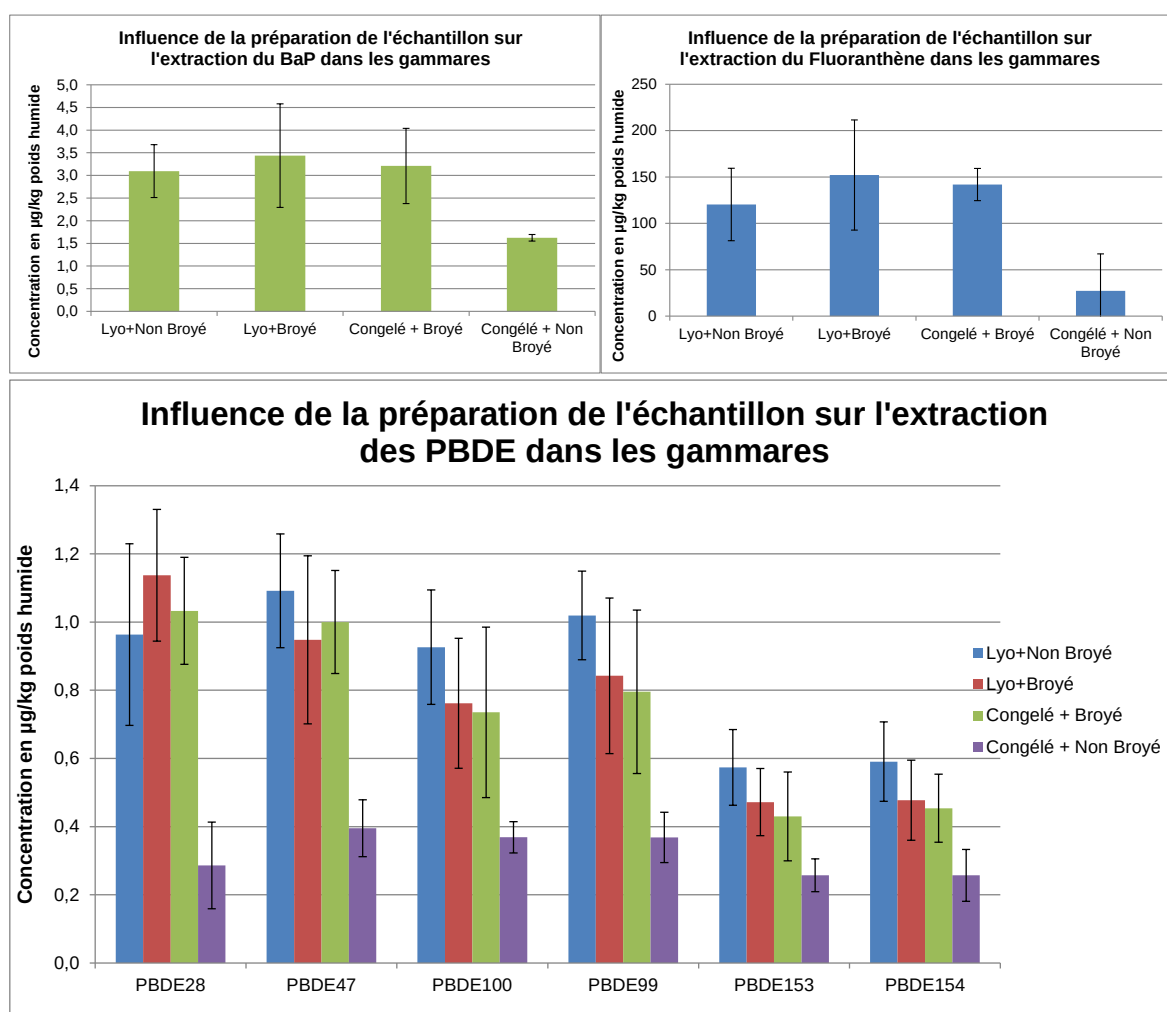


Figure 2 : Impact de la méthode de préparation des gammars sur le dosage des composés organiques HAP et PBDE.

Comme présenté dans le Tableau 6, après 4 jours d'exposition, la concentration obtenue est de 2 à 20 fois plus faible par rapport aux concentrations attendues en fonction des composés.

Tableau 6 : Comparaison entre les concentrations attendues et les concentrations obtenues lors de l'extraction des gammars exposés 4 jours.

µg/kg poids humide	BaP	Fluoranthène	PBDE28	PBDE47	PBDE100	PBDE153	PBDE154
Concentration cible (sur la base du BCF)	50	300	11				
Valeur cible (sur la base du BCF)	3	150	1			0,5	

3.4 CONCLUSIONS DE L'ETUDE PRELIMINAIRE

Au vu des résultats précédents, et afin de limiter les risques de contamination, il a été décidé de ne pas broyer les échantillons.

Pour l'étude cinétique, l'analyse pour le mercure sera réalisée sur des échantillons congelés et non broyés, alors que pour l'analyse des composés organiques (HAP et PBDE) les échantillons seront lyophilisés et non broyés.

4. ETUDE CINETIQUE

Pour fixer les conditions optimales d'exposition des gammars, une étude cinétique de la bioaccumulation a été réalisée. En effet, pour diminuer la variabilité lors de la préparation du MR, il est essentiel de se placer à un niveau de concentration au plus proche du plateau de bioaccumulation.

4.1 PREPARATION DES MATERIAUX

Irstea a produit, fin décembre 2017, de nouveaux matériaux contaminés pour étudier la cinétique de bioaccumulation. Les gammars ont été exposés 7 jours (avec un renouvellement de l'eau contaminée deux fois par jour) et un échantillonnage a été effectué tous les jours (exception faite pour le jour 1). Des témoins ont également été prélevés. Les matériaux ont été envoyés au LNE en janvier 2018 et stockés à -20°C avant analyses.

Afin d'obtenir des concentrations ciblées dans le biote (poids humide) pour les BDE = 22,1 µg/kg, BaP = 50 µg/kg et Fluo = 100 µg/kg de poids humide (Tableau 7), les concentrations ciblées dans l'étude de la cinétique sont :

- pour le mercure : 100 ng(Hg)/L
- pour les HAP:
 - BaP : 4,2 ng/L
 - Fluoranthène : 58,8 ng/L
- Pour les PBDE : 0,74 ng/L

Tableau 7 : Valeurs cibles dans le gammare et comparaison à la NQE

	Valeur cible gammare (µg/kg de poids humide)	Rapport Valeur cible biote / NQE _{biote}
PBDE 28, PBDE 47, PBDE 99, PBDE 100 PBDE 153, PBDE 154	26	3056
BaP	50	10
Fluo	102	3
Hg	530	27

Les matériaux envoyés au LNE sont résumés dans le Tableau 8

Tableau 8 : Masses des différents matériaux de gammares envoyés au LNE (mg poids humide)Témoins

	mg poids humide	Hg (1 échantillon = 20 gammare)			HAP et PBDE (1 échantillon = 60 gammare)		
	Date	A	B	C	A	B	C
J0	19/12/2017	392,94	368,87	382,05	1228	1194	1116
J2	21/12/2017	-	-	-	-	-	-
J3	22/12/2017	466,99	465,39	409,2	1335	1246	1248
J4	23/12/2017	-	-	-	-	-	-
J5	24/12/2017	430,2	446,17	463,44	1413	1369	1377
J6	25/12/2017	-	-	-	-	-	-
J7	26/12/2017	466,8	451,38	436,47	1235	1234	1414

Avec A, B, C trois réplicats pour chaque condition

Echantillons

	mg poids humide	Hg (1 échantillon = 20 gammare)			HAP et PBDE (1 échantillon = 60 gammare)		
	Date	A	B	C	A	B	C
J0	19/12/2017	-	-	-	-	-	-
J2	21/12/2017	449,18	469,83	453,07	1334	1276	1307
J3	22/12/2017	424,22	429,58	453,04	1329	1270	1272
J4	23/12/2017	456,3	446,72	463,66	1320	1384	1471
J5	24/12/2017	445,4	458,4	467,17	1401	1316	1399
J6	25/12/2017	443,83	484,48	445	1240	1367	1346
J7	26/12/2017	446,6	421,2	459,05	1390	1433	1501

Avec A, B, C trois réplicats pour chaque condition

Les méthodes de préparation des échantillons sont celles qui ont été définies à l'issue des études préliminaires.

4.2 RESULTATS DES ESSAIS DE CINETIQUE : Hg

Les analyses de mercure ont été effectuées en utilisant un analyseur de mercure (AMA254). Deux matériaux de référence certifiés ont été analysés en parallèle comme contrôle qualité, l'IAEA 470 (échantillon d'huître, 21.1 ± 2.1 µg/kg poids sec) et l'IAEA 452 (échantillon de coquille Saint-Jacques, 160 ± 20 µg/kg poids sec), en obtenant des valeurs en accord avec les valeurs certifiées.

Trois échantillons ont été analysés pour chaque jour d'exposition, de J2 à J7, et trois échantillons de gammarex témoins non-exposés ont été analysés à J0, J3, J5 et J7.

La Figure 3 présente les résultats de l'étude cinétique pour le mercure.

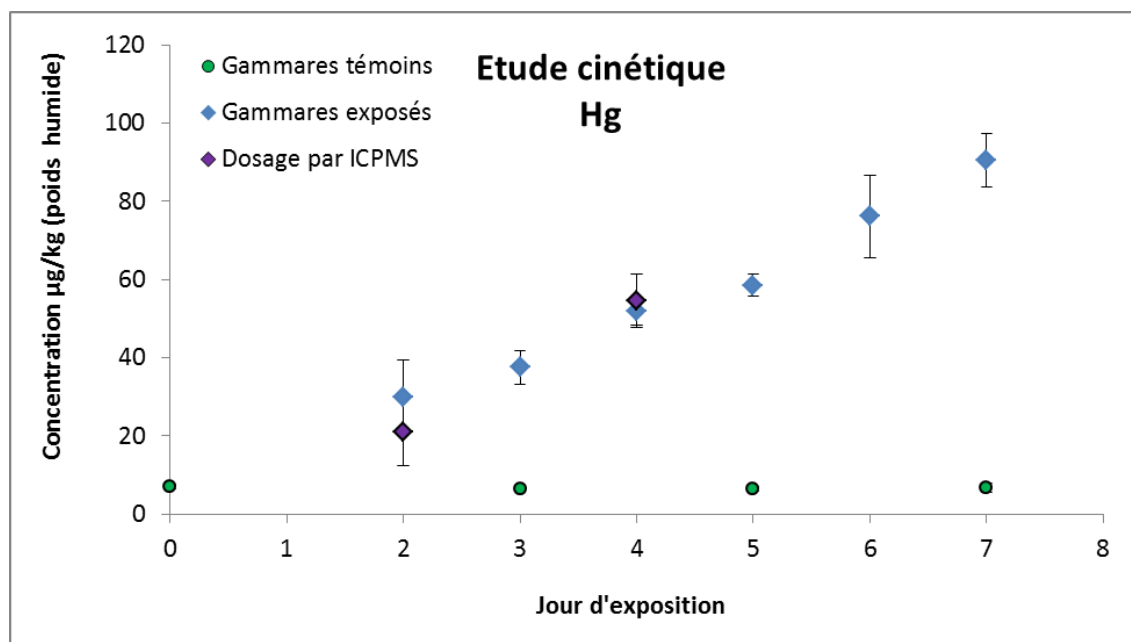


Figure 3 : Résultats de l'étude cinétique pour le mercure

Le graphique présente la concentration (moyenne des réplicats) dans les gammarex en fonction du temps d'exposition. Les barres d'erreur représentent la dispersion des résultats (2 fois l'écart type).

Les analyses ont été croisées avec les dosages effectués par ICP-MS en décembre 2017 sur les premiers échantillons envoyés par Irstea pour tester la cinétique (jours d'exposition J2 et J4). Les valeurs obtenues sont équivalentes et confirment le même niveau d'accumulation de mercure à J2 (~20-30 µg/kg poids humide) et J4 (~50 µg/kg humide). Les gammarex témoins mesurés par ICP-MS montraient une concentration de mercure de 6 µg/kg (poids humide) équivalent aux valeurs obtenues dans l'étude cinétique par analyseur de mercure (en moyenne 6,6 µg/kg poids humide).

L'étude de cinétique montre une augmentation linéaire jusqu'au jour J7, sans apparition d'un véritable plateau. Pour le mercure, aucun plateau n'a été atteint après 7 jours,

cependant les résultats sont très reproductibles, puisque aucune différence significative n'a été observée entre les résultats des essais effectués par ICP-MS (décembre 2017) et les essais de cinétique dosés par ICP-MS (juillet 2018).

4.3 RESULTATS DES ESSAIS DE CINETIQUE : HAP ET PBDE

Les gammes témoins non-exposés ont été analysés à J0, J3, J5 et J7. Pour l'analyse des PBDE et du benzo(a)pyrène, aucune contamination des témoins n'a été mise en évidence. Pour l'analyse du fluoranthène, une contamination de l'ordre de 8 µg/kg (poids humide) a été détectée. Deux échantillons ont été analysés pour J2 et J3 et trois échantillons ont été analysés pour J4 à J7.

Les Figure 4 et Figure 5 présentent les résultats de l'étude cinétique pour les PBDE et les HAP, respectivement.

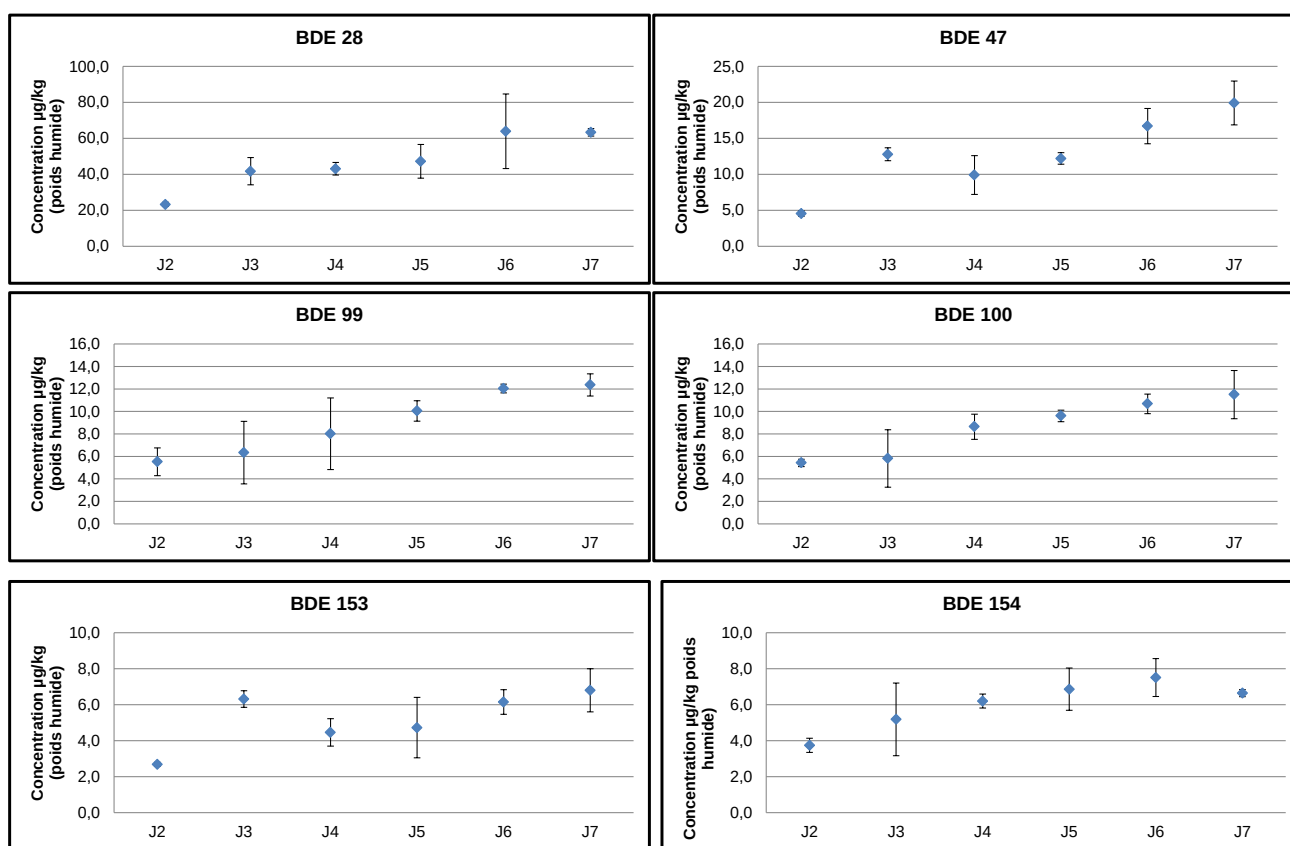


Figure 4 : Résultats de l'étude cinétique pour les BDE.

Le graphique présente la concentration de chaque BDE (moyenne des réplicats) dans les gammes en fonction du temps d'exposition. Les barres d'erreur représentent la dispersion des résultats (2 fois l'écart type).

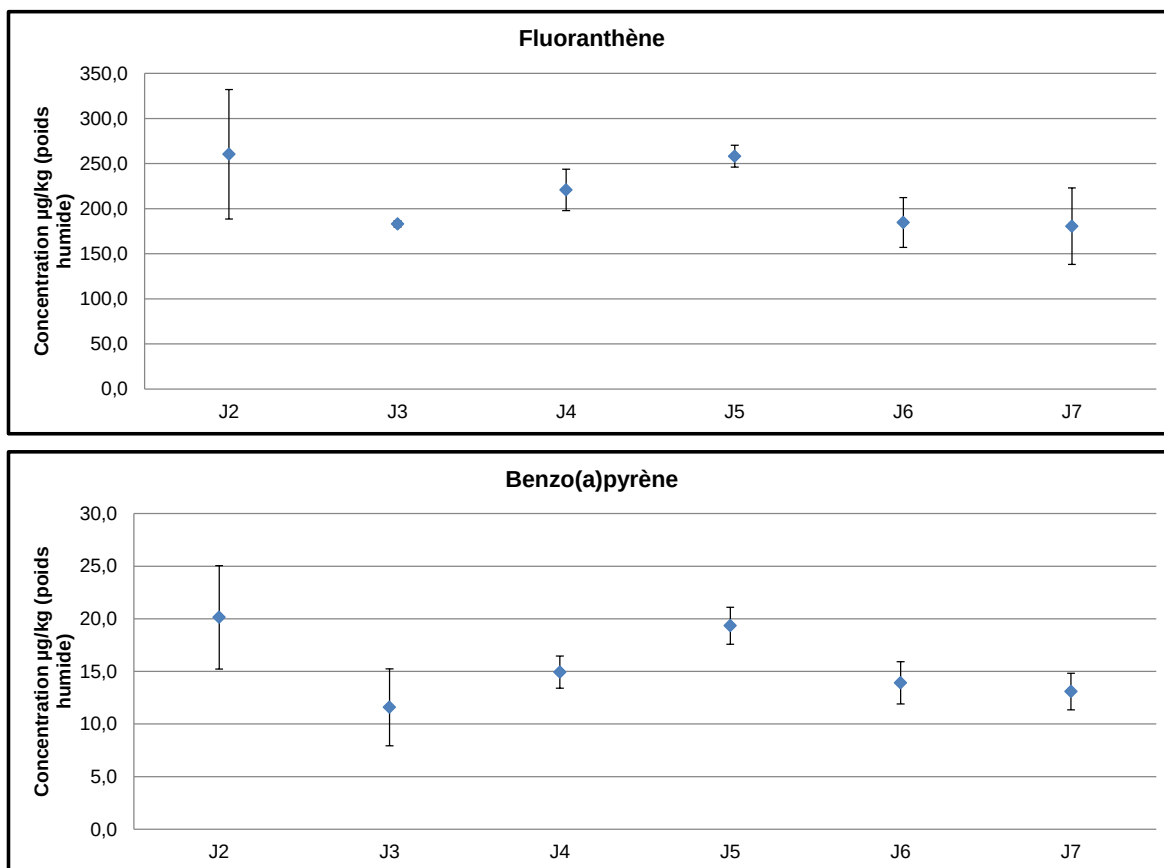


Figure 5 : Résultats de l'étude cinétique pour les HAP.

Le graphique présente la concentration (moyenne de réplicats) de chaque HAP dans les gammars en fonction du temps d'exposition. Les barres d'erreur représentent la dispersion des résultats (2 fois l'écart type).

Les résultats obtenus montrent que pour les BDE, il est nécessaire d'exposer les gammars à minima pendant 5-6 jours pour pouvoir atteindre le plateau, alors que pour les HAP et pour les concentrations testées, un plateau a été atteint dès J2, les niveaux de concentrations dans les gammars restants constants tout au long de la cinétique.

4.1 CONCLUSIONS DES ETUDES CINETIQUES

Sur la base des résultats pour l'ensemble des substances ciblées dans cette étude, il a été décidé, pour la production d'un MR pour la CIL, de réaliser une exposition sur 5 jours pour être au plus près des paliers (HAP et PBDE) tout en minimisant le temps d'exposition étant donné que les organismes ne sont pas alimentés et donc limiter le taux de mortalité (et ainsi également maintenir une bonne homogénéité et reproductibilité).

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ces études ont permis de définir une méthodologie de traitements des échantillons : dopage, mode préparation avant analyse par lyophilisation permettant de produire un matériau biote contaminé par expérimentation destiné à la réalisation de comparaisons

interlaboratoires pour la détermination des HAP, PBDE et du mercure dans les gammars.

En 2019, l'expérimentation (exposition de gammars dans des conditions optimales) a été renouvelée afin de définir les conditions de stabilité et l'homogénéité de ces matériaux. En parallèle, les matériaux contaminés obtenus seront distribués à des laboratoires experts (LABERCA, ANSES, laboratoires AQUAREF, IAEA...) pour :

- (1) évaluer la robustesse du travail réalisé dans les études 2017-2018 ;
- (2) effectuer une première évaluation des matériaux contaminés ;
- (3) évaluer l'aptitude de laboratoires « experts » à analyser cette nouvelle matrice de surveillance.

Ces résultats feront l'objet d'un rapport dans le cadre de la programmation AQUAREF 2019.

6. BIBLIOGRAPHIE

AFNOR, (2019) Norme XP T90-721, Qualité de l'eau - Encagement in situ de gammars pour la mesure de la bioaccumulation de substances chimiques.

Commission Européenne (2013), Directive 2013/39/UE du parlement européen et du conseil du 12 août 2013 modifiant les directives 2000/60/CE et 2008/105/CE en ce qui concerne les substances prioritaires pour la politique dans le domaine de l'eau. JO UE L226/1

Commission Européenne (2008), Directive 2008/105/CE, établissant des normes de qualité environnementale dans le domaine de l'eau, modifiant et abrogeant les directives du Conseil 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE, 86/280/CEE et modifiant la directive 2000/60/CE. JO EU L 348/84.

EC. Technical Report 2014 – 083. Common implementation strategy for the Water Framework Directive (2000/60/EC). Guidance Document N°32 on biota monitoring (the implementation of EQS-Biota) under the Water Framework Directive.

Geffard O., Besse, J.P., A. Chaumot, A. François, R. Recoura-Massaquant, C. Lopes, J. Gahou, G. Grisot, M. Coquery (2014). Rapport de synthèse de l'étude pilote : déploiement de l'outil gammare encagé au niveau national, résultats pour les métaux ciblés. Rapport IRSTEA-ONEMA, 60p.

Recoura-Massaquant R., O. Geffard, Besse, J.P., A. Chaumot, A. François, C. Lopes, C. Miège, A. Roussel-Gale, F. Servetto, M. Coquery (2014). Rapport de synthèse de l'étude pilote : déploiement de l'outil gammare encagé au niveau national, résultats pour les substances organiques ciblées. Rapport IRSTEA-ONEMA, 66 p.

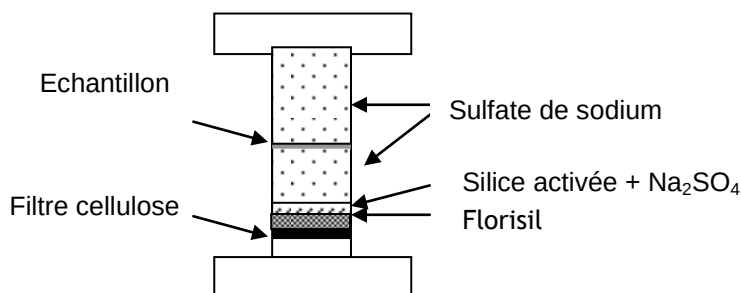
Ministère de la Transition écologique et solidaire (2017). Note technique du 26 décembre 2017 relative à la mise en œuvre du suivi des substances de l'état chimique des eaux de surface dans le biote dans le cadre de la directive cadre sur l'eau conformément à la directive 2013/39/UE du Parlement européen et du Conseil du 12 août 2013.

Annexe 1: Méthode d'analyse des HAP et des BDE

Le principe de la méthode sur une extraction/purification par fluide pressurisé (ASE®), suivie d'une étape de purification sur cartouche et une analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. La méthode repose sur la mise en œuvre de la dilution isotopique associée à la spectrométrie de masse.

Extraction :

Les extractions ont été réalisées sur un système ASE 200® (Dionex) couplé à un contrôleur de solvant. La cellule est remplie comme indiquée sur le schéma ci-dessous :



Prise d'essai : 1 lot correspondant à 60 gammarees soit environ 300 mg poids sec

L'extraction est réalisée en suivant le programme suivant :

Solvant	Dichlorométhane
Température	100°C
Pression	140 bar
Temps static	10 minutes
Temps de chauffage	5 minutes
Flush	70%
Temps de purge	100 secondes
Nombre de cycle	2

Les extraits sont ensuite évaporés à sec au Speedvac® à 45°C avant reprise dans 500µL d'acétonitrile.

Purification

Une première purification est réalisée directement dans la cellule avec la silice activée et du florisil. Une deuxième purification de l'extrait est réalisée sur cartouche Supelclean™ EZ-POP NP (Supelco, 12 mL).

- Les cartouches SPE EZ-POP NP sont préalablement conditionnées avec 10 mL d'acétone, sécher 10 minutes sous vide après élution de l'acétone.
- Déposer l'extrait en tête de la colonne SPE EZ-POP NP
- Rincer au solvant le flacon dans lequel se trouvait l'extrait et ajouter le solvant de rinçage en tête de colonne.
- Eluer les HAP avec 2 x 7,5 mL d'acétonitrile.
- Evaporer l'extrait à sec au Speedvac® à 45°C puis reprendre dans 200µL d'isooctane.
- Injecter l'extrait sur le GC/MS.

Méthode d'analyse par GC/MS²

Les composés ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse (Agilent 7890A) couplée à la spectrométrie de masse (Quattro microGC, Waters).

La colonne utilisée est une colonne DB-5MS de chez Agilent, 30m x 0,25 mm ID x 0,25 µm film.

Conditions GC:

- Gas : Hélium
- *Injection*: 10µL en mode solvant vent (80 ml/min jusqu'à 1 min), à 280°C (60°C pendant 1 min, 720°C/min jusqu'à 310°C)
- *Débit de gaz vecteur*: 1,2 mL/min d'hélium
- *Température du four* : 50°C pendant 2 min, 25°C/min jusqu'à 300°C (pendant 10 min)

Conditions MS :

- Température de la ligne de transfert: 280°C
- Température de la source: 210°C
- Mode EI (70eV).

Les HAP sont analysés en mode MRM

	m / z ion de quantification	m / z ion de qualification
Fluoranthène D10	212.0>212.0	-
Fluoranthène	202.0>202.0	202.0>200.0
Benzo(a)pyrène D12	264.0>264.0	-
Benzo(a)pyrène	252.0>252.0	252.0>250.0
Indéno(1,2,3-cd)pyrène D12	288.0>288.0	-
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	276.0>276.0	276.0>274.0

Les BDE sont analysés en en mode MRM

	Transition de quantification	Transition de qualification		Transition de quantification	Transition de qualification
BDE28	407.8>247.0	247.8>139.0	BDE28	417.8>258.0	258.0>150.1
BDE47	485.7>325.7	325.7>138.0	BDE47	497.8>337.8	337.8>149.1
BDE99	565.2>405.8	405.8>137.0	BDE99	575.6>415.6	415.>148.2
BDE100	565.2>405.8	405.8>137.0	BDE100	575.6>415.6	415.>148.2
BDE153	643.3>483.7	483.7>323.8	BDE153	655.6>495.8	495.5>335.8
BDE154	643.3>483.7	483.7>374.8	BDE154	655.6>495.8	495.5>335.8