

Développement d'un matériau de référence « gammares » pour la mise en œuvre de la surveillance chimique sur biote - résultats d'une comparaison interlaboratoires

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

Mars 2020

Rapport

Contexte de programmation et de réalisation

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du programme scientifique et technique AQUAREF pour l'année 2019, dans le cadre du thème « E » «Garantir la qualité des données bancarisées».

Auteur (s) :

Paola FISICARO
LNE
Paola.fisicaro@lne.fr

Carine FALLOT
LNE
carine.fallot@lne.fr

Caroline OSTER
LNE
Caroline.oster@lne.fr

Enrica ALASONATI
LNE
enrica.alasonati@lne.fr

Beatrice LALERE
LNE
beatrice.lalere@lne.fr

Michèle DESENFANT
LNE
Michele.desenfant@lne.fr

Marina COQUERY
INRAE
Marina.coquery@inrae.fr

Olivier GEFFARD
INRAE
olivier.geffard@inrae.fr

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

Vérification du document :

Aymeric DABRIN
INRAE
Aymeric.dabrin@inrae.fr

Les correspondants

AFB : Nicolas GAURY, nicolas.gaury@afbiodiversite.fr
Olivier PERCEVAL, Olivier.perceval@afbiodiversite.fr

LNE : Sophie VASLIN-REIMANN, sophie.vaslin-reimann@lne.fr

Référence du document : P. Fisicaro, C. Fallot, C. Oster, E. Alasonati, B. Lalere, M. Desenfant, O. Geffard et M. Coquery. Développement d'un matériau de référence « gammars » pour la mise en œuvre de la surveillance chimique sur biote - résultats d'une comparaison interlaboratoires 2020, Rapport AQUAREF, 28 pages

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

SOMMAIRE

1. CONTEXTE ET OBJECTIFS	7
2. ORGANISATION DE LA CIL	8
2.1 Préparation des matériaux d'essai.....	8
2.2 Participants	9
3. RESULTATS DE L'INTERCOMPARAISON.....	9
3.1 Résultats fournis par les participants	9
3.2 Traitement statistique des résultats	14
3.3 Assignation des valeurs de référence et de leurs incertitudes au matériau de référence	16
4. CONCLUSION.....	18
5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	19
ANNEXE 1	21
ANNEXE 2	27

*DEVELOPPEMENT D'UN MATERIAU DE REFERENCE « GAMMARES » POUR LA MISE EN ŒUVRE DE LA SURVEILLANCE CHIMIQUE SUR BIOTE - RESULTATS D'UNE COMPARAISON INTERLABORATOIRES.
P. FISICARO, C. FALLOT, C. OSTER, E. ALASONATI, B. LALERE, M. DESENFANT, O. GEFFARD, M. COQUERY*

RESUME

Le but de cette étude était d'évaluer la faisabilité de produire un matériau de référence (MR) à matrice biote (gammares) avec des valeurs de référence pour des substances organiques hydrophobes et du mercure à travers l'organisation d'une comparaison interlaboratoires (CIL) avec des laboratoires experts.

Une fois cette faisabilité validée, cette démarche pourra être utilisée par les organisateurs d'essais d'aptitude (OCIL) pour évaluer la performance des méthodes mises en œuvre par les laboratoires agréés et leur validation sur des matrices représentatives des matrices biotes utilisées dans le cadre de la surveillance réglementaire.

Les résultats de la CIL montrent que le protocole développé pour la préparation des gammares est suffisamment reproductible pour permettre d'obtenir les concentrations ciblées pour les substances HAP (2 composés), PBDE (6 composés) et mercure au niveau des normes de qualité environnementale (NQE) visées. Le MR a été distribué à 7 laboratoires experts qui ont réalisé les analyses en double. Un traitement statistique des données a été appliqué afin de définir les concentrations de référence et les incertitudes associées. Le matériau était suffisamment homogène et stable pendant la durée de la comparaison pour ne pas induire d'impact significatif sur l'incertitude des mesures. Pour toutes les substances, les incertitudes élargies pour les valeurs assignées étaient comprises entre 6 et 15 % pour des concentrations proches des NQE.

Mots clés :

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

DEVELOPMENT OF A "GAMMARIDS" REFERENCE MATERIAL FOR THE IMPLEMENTATION OF CHEMICAL MONITORING ON BIOTA - RESULTS OF AN INTERLABORATORY COMPARISON
P. FISICARO, C. FALLOT, C. OSTER, E. ALASONATI, B. LALERE, M. DESENFANT, O. GEFFARD, M. COQUERY

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the feasibility of producing a reference material (RM) in a biota matrix (gammarids) with reference values assigned for hydrophobic organic substances and mercury through the organization of an interlaboratory comparison among expert laboratories.

Once this feasibility demonstrated, the approach can be used by proficiency testing organizers (OCIL) to assess the performance of the methods implemented by approved laboratories and their validation on matrices representative of biota matrices.

The results of the ILC show that the protocol developed for the preparation of gammarids is sufficiently reproducible to obtain the targeted concentrations for PAHs, PBDEs and mercury at EQS level. The material was sufficiently homogeneous and stable for the duration of the comparison exercise, so that the impact on the uncertainty of the measurements was negligible. For all substances, expanded uncertainties for the assigned values ranged between 6 and 15% for concentrations close to the EQS.

Key words: Water monitoring, biota, reference material, gammarids, mercury, PAH, PBDE

1. Contexte et objectifs

L'évaluation des performances d'une méthode et sa validation sont essentielles pour permettre au laboratoire de produire des données analytiques fiables. Deux voies principales sont possibles pour évaluer les performances d'une méthode :

- l'utilisation de matériaux de référence (certifiés) dont la matrice est représentative des échantillons ciblés.
- la participation à des comparaisons interlaboratoires (CIL) avec assignation de la valeur de référence au matériau d'essai.

A la suite de la transposition en droit français de la Directive 2013/39/CE [1] et de sa mise en application dans les programmes de surveillance, la matrice biote est apparue comme un enjeu prioritaire dans le cas des substances organiques hydrophobes et du mercure. Pour chaque substance ou famille de substances ciblées (n=9), la directive fixe une norme de qualité environnementale (NQE) faisant référence à un biote pertinent (poisson entier ou filet, mollusques, crustacés). Cependant, chaque Etat membre peut dériver une NQE sur un biote alternatif pour autant que cette norme assure un niveau de protection équivalent à la norme originelle. La stratégie nationale inclut une surveillance des substances prioritaires (SP) dans le gammare (organismes encagés) [2]. Les gammares sont une espèce qui joue un rôle très important dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques, connue pour être un accumulateur des substances chimiques, métalliques et organiques, ce qui en fait une espèce sentinelle en écotoxicologie [3].

A terme, les laboratoires qui réalisent les analyses de ces substances dans le biote devront être titulaires de l'agrément des laboratoires effectuant des analyses dans le domaine de l'eau et des milieux aquatiques, ou à défaut être accrédités et respecter les limites de quantification listées dans l'avis en vigueur relatif aux limites de quantification des couples « paramètre-matrice » de cet agrément.

Ainsi, par exemple, les laboratoires doivent évaluer les performances de leurs méthodes et effectuer les validations nécessaires sur des matrices représentatives des biotes utilisés en surveillance.

Dans le cadre des travaux du cycle AQUAREF précédent (2013-2015) sur les inventaires de matériaux de référence certifiés (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.

En réponse à ce besoin, AQUAREF a conduit une étude de faisabilité d'un matériau de référence (MR) de gammares.

L'étude était divisée en trois parties :

- Evaluation de différentes méthodes de préparation du matériau avec l'objectif de définir sous quelle forme le MR doit être distribué aux utilisateurs.
- Evaluation de cinétiques de bioaccumulation dans des conditions contrôlées pour les substances visées dans l'étude à travers des essais d'exposition de gammares en laboratoire, afin de proposer un protocole de contamination des matériaux reproductible.

Les travaux de ces deux parties sont détaillés dans le rapport Aquaref 2018 sur le développement d'un outil de traçabilité chimique MRC gammares [3].

- Organisation d'une comparaison interlaboratoires avec des laboratoires experts afin d'évaluer la faisabilité de produire un matériau de référence homogène et stable pour l'organisation d'une comparaison interlaboratoires.

Cette troisième partie fait l'objet de ce rapport.

2. Organisation de la CIL

2.1 Préparation des matériaux d'essai

Les substances visées dans l'étude étaient des molécules représentatives de la liste des substances prioritaires ciblées pour lesquelles des NQE biote sont disponibles : métaux (Hg), 2 HAP (benzo(a)pyrène [BaP] et fluoranthène) et 6 PBDE (PBDE 28, PBDE 47, PBDE 99, PBDE 100, PBDE 153, PBDE 154).

Les concentrations cibles étaient les suivantes :

- Hg : de 100 à 500 µg/kg de gammars lyophilisés (soit environ 500 à 2500 µg/kg poids humide)
- HAP : de 10 à 300 µg/kg de gammars lyophilisés (soit environ 50 à 1500 µg/kg poids humide)
- PBDE : de 5 à 75 µg/kg de gammars lyophilisés (soit environ 25 à 375 µg/kg poids humide)

Ces valeurs, plus élevées que les NQE, ont été fixées pour prendre en compte les limites analytiques pour certaines substances [3].

Les matériaux (gammars) contaminés ont été produits par INRAE. L'exposition des gammars s'est faite via l'eau, sans ajout de nutriments, à l'obscurité, pour limiter la dégradation des substances organiques, et en utilisant des solutions dont les solvants sont compatibles à la fois avec les substances (HAP, PBDE et mercure) et les organismes. Pour limiter le problème d'adsorption et pour avoir une exposition constante, le bac d'élevage contenant les gammars avec l'eau contaminée a été renouvelé deux fois par jour. Les expositions des gammars ont été réalisées séparément pour HAP/PBDE d'une part, et mercure d'autre part.

Les solutions permettant de doper l'eau des aquariums ont été préparées par le LNE. Pour les HAP et PBDE les solutions ont été préparées dans l'acétone, solvant compatibles avec les substances mais dont la concentration a dû être ajustée afin de ne pas dépasser une concentration en acétone de 1/20 000ème dans l'eau des aquariums. Pour le mercure, les solutions ont été préparées dans l'eau déminéralisées acidifiée à 0.5 % avec de l'acide nitrique (pour la stabilité du mercure) mais dont la concentration a dû être ajustée afin de ne pas dépasser une concentration en eau déminéralisée de 1% dans l'eau des aquariums.

Le temps d'exposition a été fixé à 5 jours. Les gammars exposés ont été regroupés, puis répartis en échantillons de 20 individus pour la mesure du Hg et des échantillons de 60 individus pour la mesure des composés organiques, et congelés, puis lyophilisés sans broyage, selon les procédures définies précédemment [3].

La préparation des matériaux d'essais a été réalisée en suivant les recommandations de l'ISO 17034:2016 [4]. L'échantillon mère a été aliquoté en flacons. Une partie de ces flacons a servi à l'évaluation de la stabilité durant le temps de la CIL (1 mois) (voir chapitre 3 et annexe 2), une autre partie a servi à la réalisation de la comparaison interlaboratoires.

Ainsi, les échantillons suivant ont été produits :

- 23 flacons de 60 gammars secs (soit environ 300 mg poids sec par flacon) pour les composés organiques (HAP, PBDE)
- 22 flacons de 20 gammars secs (soit environ 100 mg poids sec par flacon) pour le mercure

Des lots de flacons (2 flacons pour les HAP/PBDE, 2 flacons pour le mercure) ont été envoyés aux participants dans des emballages protégeant de la lumière et de l'humidité en présence d'un dessicant. Le poids sec d'organismes dans chaque flacon a également été communiqué.

Les consignes suivantes ont été données aux participants : à réception, le stockage des échantillons devait se faire dans un dessiccateur (afin d'éviter la reprise en eau) et si possible à l'abri de la lumière (cf. effet phototoxique du BaP). Les laboratoires étaient invités à utiliser la totalité de l'échantillon reçu, en se référant à la masse pesée au préalable, précisée aux laboratoires lors de l'envoi des matériaux d'essai.

Les laboratoires ont été invités à fournir les informations suivantes :

- A minima 1 résultat par flacon et par composé, exprimé en fraction de masse de gammars poids sec ;
- La date de l'analyse, la masse d'échantillon pour les analyses, la description de la méthode d'analyse incluant la préparation (extraction pour les composés organiques), la LQ pour chaque composé et l'incertitude de mesure ($k=2$).

2.2 Participants

Compte tenu du nombre limité d'échantillons qui pouvait être préparé et du but de la comparaison interlaboratoires, à savoir l'évaluation de la faisabilité de la fabrication d'un MR, un nombre restreint de laboratoires a été invité à participer. Le choix s'est porté sur des laboratoires experts dans les analyses des substances visées dans la CIL et du biote aquatique.

Les laboratoires qui ont participé sont les suivants :

Pour l'analyse du mercure : IAEA, IFREMER, IRSTEA, La Drôme (LDA26), LNE, Université de Bordeaux (UMR EPOC 5808).

Pour l'analyse des composés organiques HAP et PBDE : IAEA, LABERCA (ONIRIS/INRA), La Drôme (LDA26), LNE.

Un code a été assigné à chaque laboratoire et ils seront donc anonymes dans la suite du rapport.

3. Résultats de l'intercomparaison

3.1 Résultats fournis par les participants

Les figures 1 à 9 montrent les résultats fournis par les laboratoires participants pour les 9 substances analysées.

En abscisse sont reportés les codes assignés à chaque laboratoire : H(x) pour les participants aux analyses du Hg et O(x) pour les participants aux analyses des composés organiques ; f(x) correspondent aux flacons analysés.

Les résultats fournis par les laboratoires participants pour les 9 substances analysées sont donnés dans les tableaux en Annexe 1.

Les résultats des laboratoires sont représentés par des points noirs (moyenne par flacon, exprimée en µg/kg poids sec) et l'incertitude élargie associée. Les lignes rouges représentent les valeurs de référence, les lignes pointillées représentent les incertitudes élargies (k=2) des valeurs assignées. Le traitement statistique pour le calcul de la valeur de référence est présenté dans le paragraphe 3.2.

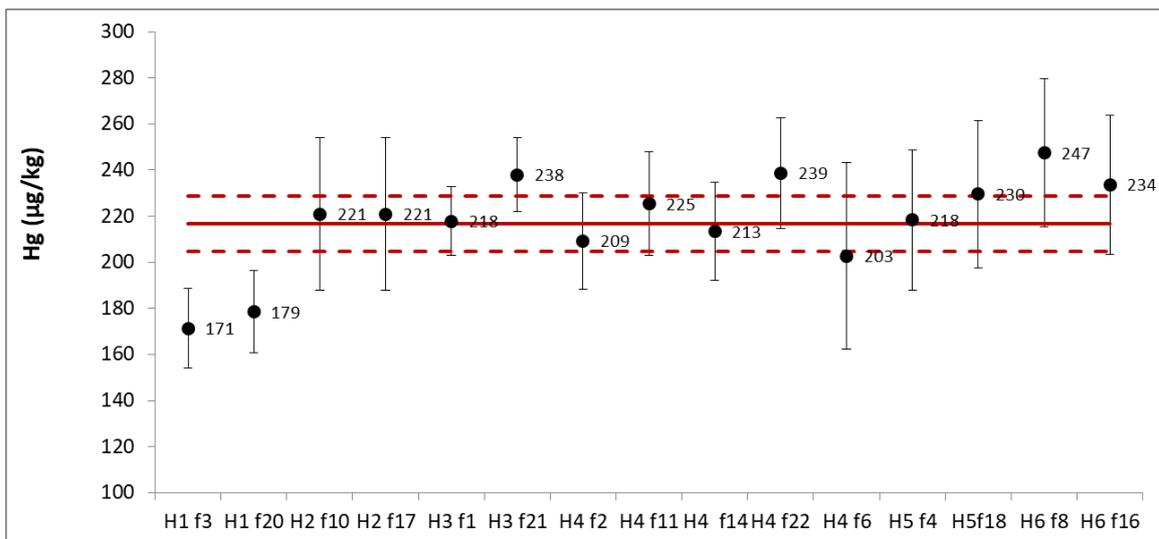


Figure 1 : résultats des analyses des concentrations en mercure

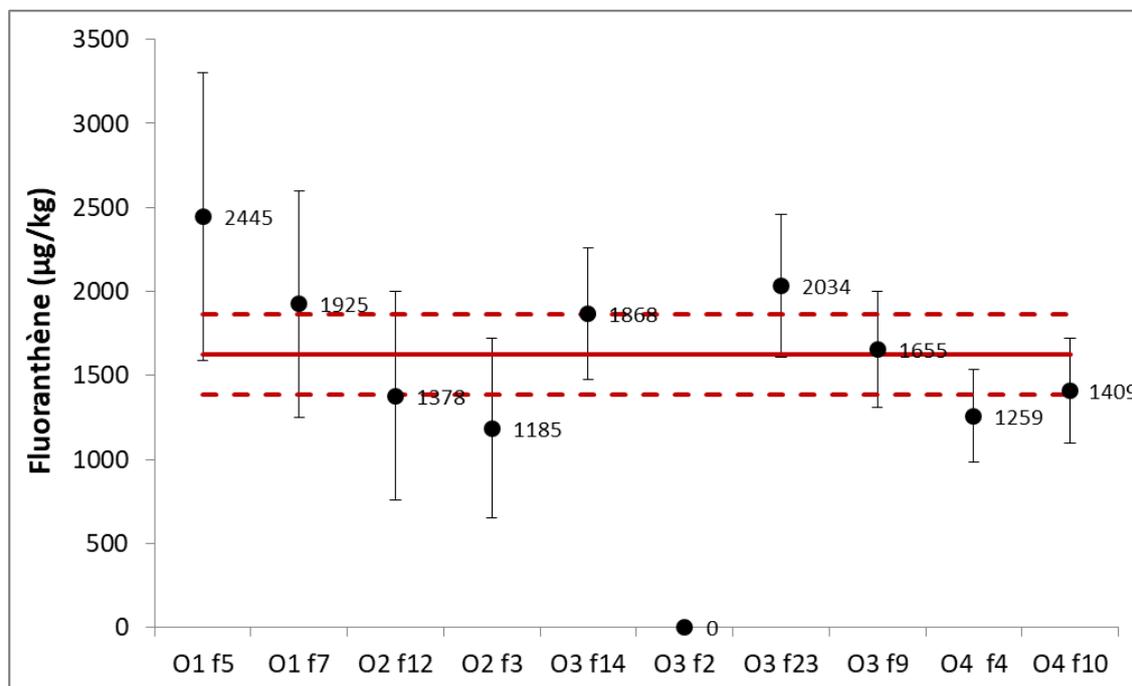


Figure 2 : résultats des analyses des concentrations en Fluoranthène.

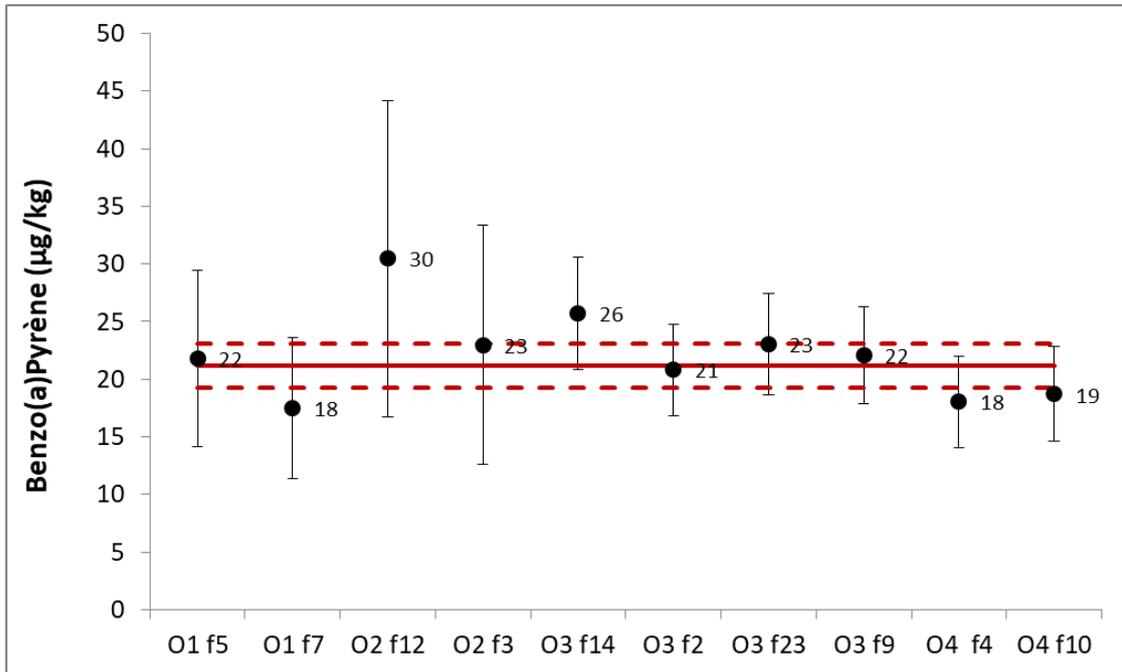


Figure 3 : résultats des analyses des concentrations en Benzo(a)Pyrène.

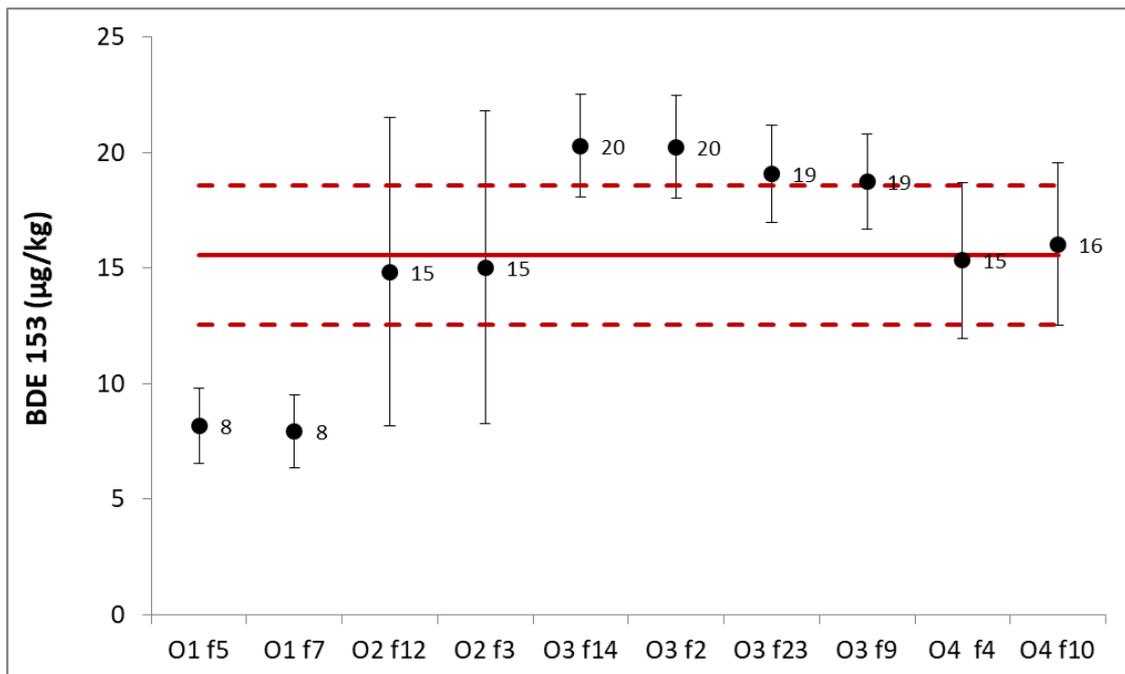


Figure 4 : résultats des analyses des concentrations en BDE 28.

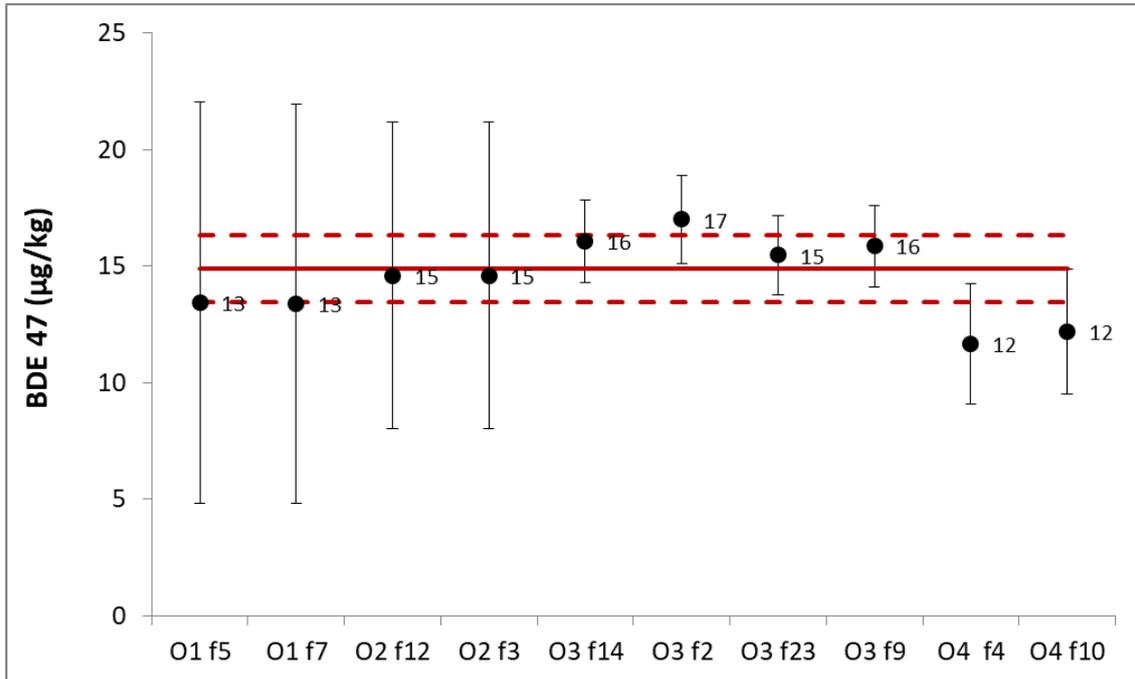


Figure 5 : résultats des analyses des concentrations en BDE 47.

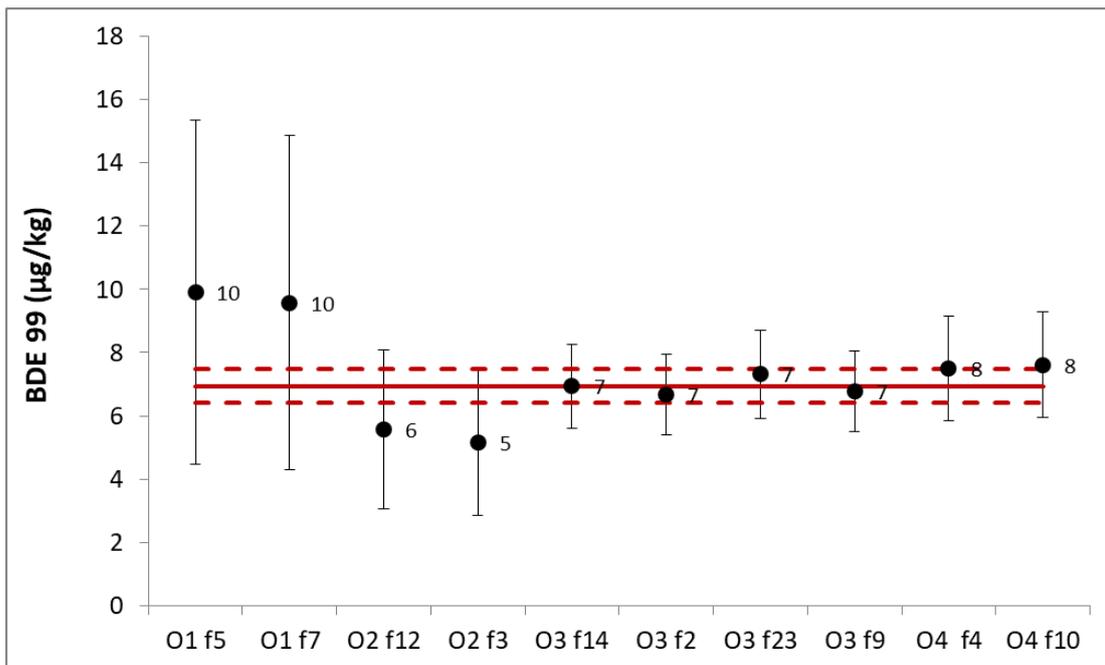


Figure 6 : résultats des analyses des concentrations en BDE 99.

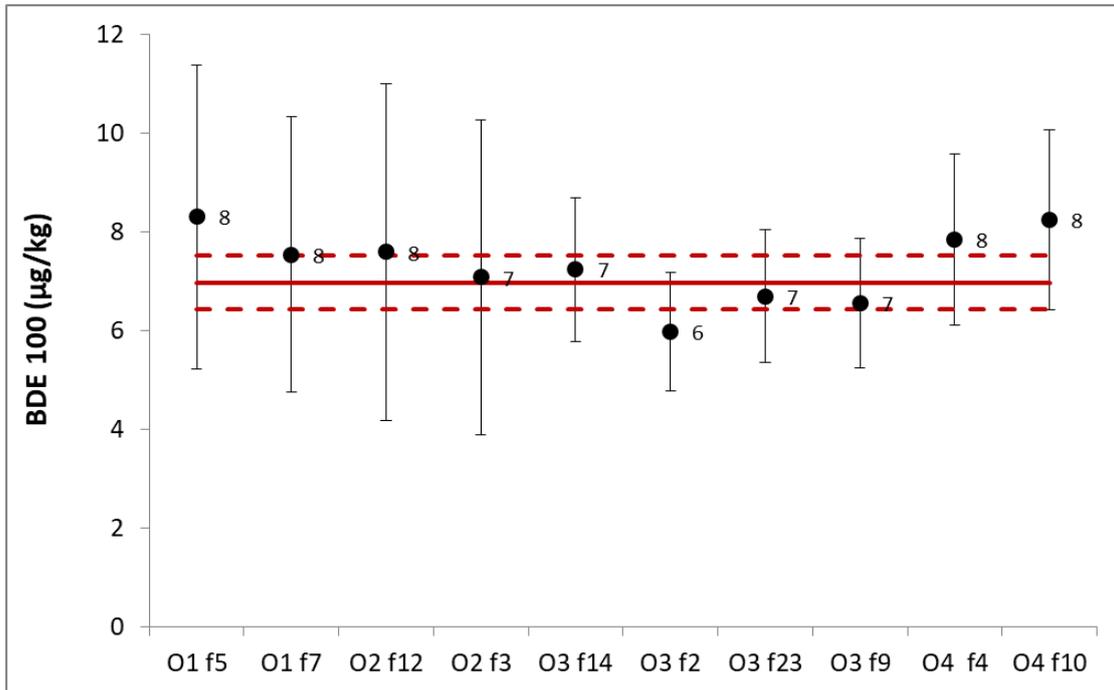


Figure 7 : résultats des analyses des concentrations en BDE 100.

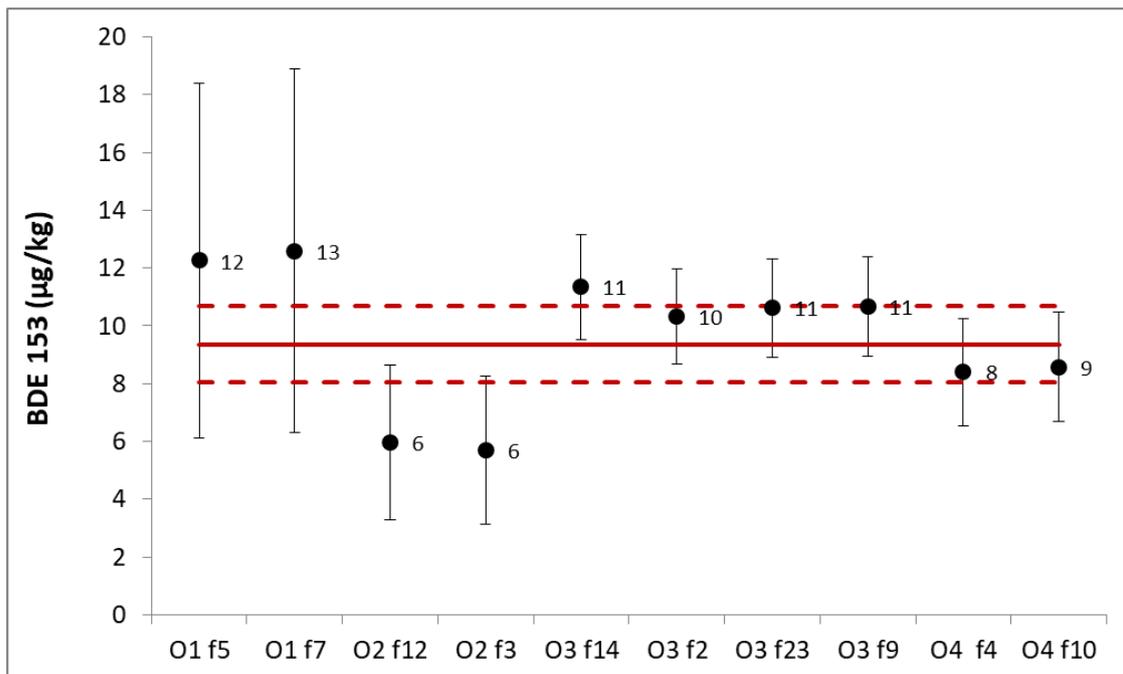


Figure 8 : résultats des analyses des concentrations en BDE 153.

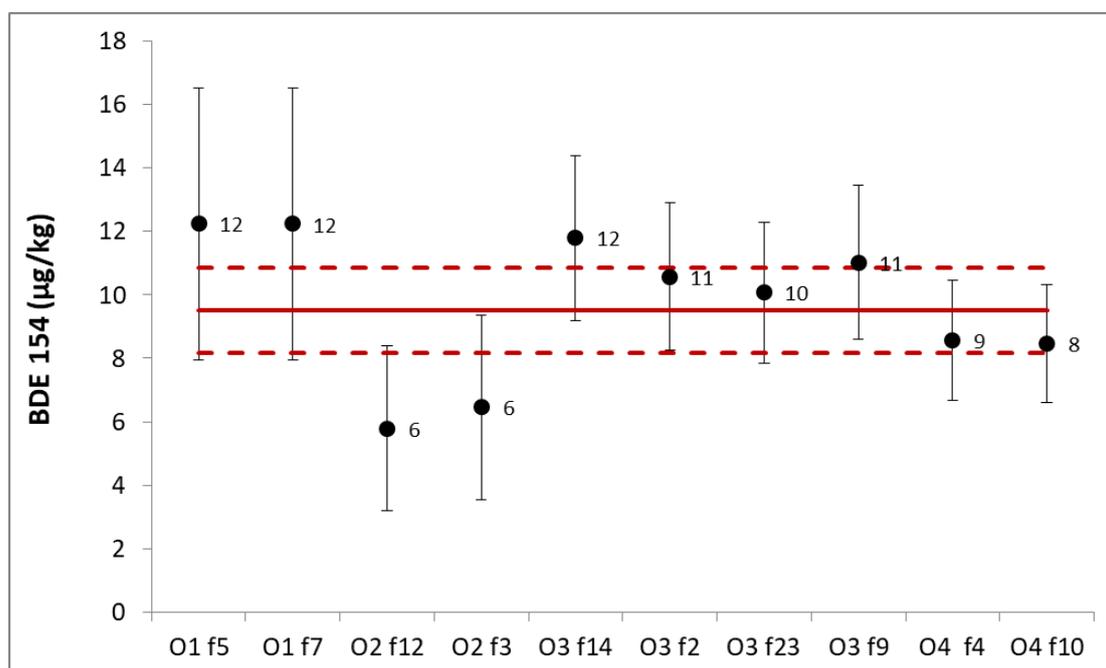


Figure 9 : résultats des analyses des concentrations en BDE 154.

Le LNE était en charge du traitement statistique des résultats fournis par les laboratoires en vue d'assigner une valeur pour chacun des composés visés.

3.2 Traitement statistique des résultats

Chaque laboratoire a fourni au moins deux résultats (au moins un résultat par flacon). Étant donné le but de la comparaison, à savoir l'assignation de valeurs de référence pour les concentrations des composés visés dans un MR et non pas l'évaluation des compétences des laboratoires participants, le choix a été fait de présenter et d'analyser les résultats par flacon plutôt que de moyenner directement par laboratoire.

Dans ces conditions, l'hypothèse d'indépendance de tous les résultats n'est pas assurée. Cependant, les résultats de chaque flacon ont été considérés, même s'ils ne sont pas indépendants, pour ne pas introduire d'hypothèses sur l'incertitude des moyennes.

Pour le choix de l'estimateur des valeurs de référence plusieurs approches ont été considérées :

1) **Moyenne pondérée de l'inverse des variances (x_w)** définie selon l'équation 1 :

$$x_w = \sum_{i=1}^p w_i x_i \tag{Équation 1}$$

avec :

$$w_i = \frac{1}{u^2(x_i) \sum_{j=1}^p \left[\frac{1}{u^2(x_j)} \right]}$$

Équation 2

où x_i est le résultat fourni par le laboratoire i , $u(x_i)$ est l'incertitude type de x_i et p le nombre de participants à la CIL.

Cette approche est le choix le plus classique et c'est une bonne solution quand les données sont « cohérentes » selon un test de cohérence. Le test de cohérence mis en œuvre au cours de cette étude est le test du χ^2 , qui teste l'hypothèse que les laboratoires partagent une valeur moyenne commune et que les écarts par rapport à cette valeur sont normalement distribués avec moyenne 0 et écart type u_i [5].

Ce test du χ^2 a montré que la cohérence des données fournies par les participants n'était pas toujours démontrée (Tableau 1) ce qui indique que le choix de la moyenne pondérée n'est pas adaptée.

Tableau 1 : Résultats des tests de cohérence

Substance	Résultat test χ^2 à 1%
Hg	Non cohérent
Fluoranthène	Non cohérent
Benzo(a)Pyrène	Cohérent
PBDE 28	Non cohérent
PBDE 47	Cohérent
PBDE 99	Cohérent
PBDE 100	Cohérent
PBDE 153	Non cohérent
PBDE 154	Non cohérent

2) **Moyenne robuste.** Cette approche, basée sur l'algorithme A décrit dans la norme NF ISO 13528:2015 annexe C [6] est très utilisée pour l'évaluation des résultats des CIL. Cependant, l'algorithme A ne considère que les valeurs moyennes sans prendre en compte les incertitudes fournies par les participants. Etant donné que nous disposons des incertitudes fournies par les participants, cette approche n'est pas apparue pertinente pour cette étude.

3) **Approche « Excess variance » ou procédure DerSimonian-Laird (DL) [7,8].** Cette approche permet de tenir compte des incertitudes estimées par chaque laboratoire et de l'incohérence des données sans éliminer aucune valeur.

L'approche est basée sur le calcul de la moyenne pondérée où le poids \hat{w}_i est calculé à partir de l'incertitude des résultats individuels augmentés d'un facteur supplémentaire λ , commun à tous les laboratoires, qui tient compte d'une potentielle dispersion inexpliquée des données.

La valeur assignée, x_{DL} (DerSimonian-Laird), est calculée selon l'équation 3 :

$$x_{DL} = \sum_{i=1}^p \tilde{w}_i x_i$$

Equation 3

avec :

$$\tilde{w}_i = \frac{\frac{1}{u^2(x_i) + \lambda}}{\sum_{j=1}^p \left[\frac{1}{u^2(x_j) + \lambda} \right]}$$
Equation 4

et :

$$\lambda = \frac{\sum_{i=1}^p \left[\frac{1}{u^2(x_i)} (x_i - x_w)^2 \right] - (p - 1)}{\sum_{i=1}^p \left[\frac{1}{u^2(x_i)} \right] - \frac{\sum_{i=1}^p \left[\frac{1}{u^4(x_i)} \right]}{\sum_{i=1}^p \left[\frac{1}{u^2(x_i)} \right]}}$$
Equation 5

L'incertitude de la valeur assignée est estimée selon l'équation 6 :

$$u(x_{DL}) = \sqrt{\sum_{i=1}^p \frac{\tilde{w}_i^2 (x_i - x_{DL})^2}{1 - \tilde{w}_i}}$$
Equation 6

Cette approche a donc été retenue pour exploiter les résultats des laboratoires et déterminer les valeurs de référence assignées pour toutes les substances.

3.3 Assignment des valeurs de référence et de leurs incertitudes au matériau de référence

Pour l'assignation des valeurs et de leurs incertitudes aux 9 substances, les préconisations de la norme ISO 17034:2016 [4] et du guide ISO 35 :2017 [9] ont été suivies.

Les valeurs ont été assignées en utilisant le traitement statistique décrit au paragraphe 2.2, équation 3.

Pour l'incertitude, les composantes dues à la caractérisation du matériau, à une possible inhomogénéité des échantillons et à une possible instabilité des substances doivent être prises en compte, selon la loi de propagation suivante :

$$u_{MR} = (u_{car}^2 + u_{hom}^2 + u_{stab}^2)^{1/2}$$

où

u_{car} = incertitude type associée à la caractérisation (dans le cas de cette étude, $u_{car} = u(x_{DL})$ calculée selon l'équation 6),

u_{hom} = incertitude type associée à l'homogénéité

u_{stab} = incertitude type associée à la stabilité durant la durée de la CIL.

Les valeurs assignées et les incertitudes (u_{car}) ont été évaluées sur la base du traitement statistique décrit au paragraphe 2.2, respectivement équations 3 et 6.

Le choix retenu de caractérisation étant le résultat d'une comparaison interlaboratoires, l'incertitude de caractérisation inclut déjà le facteur homogénéité. Ce qui est encore d'autant plus vrai avec l'estimateur retenu (approche DerSimonian-Laird).

La stabilité des échantillons a été suivie pendant la durée de la CIL par le LNE.

Afin de juger de l'impact de la stabilité dans le temps, on a procédé au test statistique de Student de pente nulle (Equation 8) en se basant sur 3 points dans le temps (T0, T15 et T34 jours) avec plusieurs réplicats (au moins 3 flacons par point temporel). En ayant choisi un modèle linéaire :

$$Y = b_0 + b_1X \quad \text{Equation 7}$$

on procède à l'estimation des paramètres du modèle (intercepte b_0 et pente b_1) et de leurs écarts-type respectifs $s(b_0)$ et $s(b_1)$.

Le test de pente nulle est réalisé via le calcul de la statistique t_{b_1} :

$$t_{b_1} = |b_1| / s(b_1) \quad \text{Equation 8}$$

et de la comparaison de cette statistique à une valeur critique du t de Student pour $n - 2$ degrés de liberté à un niveau de confiance de 95%. Si le test est non significatif, il est admis de considérer que le matériau est stable et de fixer l'incertitude associée à la stabilité à zéro.

Le test statistique de Student appliqué n'a révélé aucune instabilité significative pour les substances visées dans la CIL. La composante u_{stab} a été donc considérée égale à zéro. A titre d'exemple, le traitement complet appliqué au Benzo(a)Pyrène est montré en Annexe 2.

Le tableau 2 indique les valeurs de référence assignées pour les 9 substances avec les incertitudes type et élargies ($k=2$).

Tableau 2 : Valeurs de référence et leurs incertitudes pour les 9 substances visées dans la CIL pour le MR gammares

Substance	Valeur (µg/kg Poids sec)	Incertitude type (%)	Incertitude élargie (%) (k=2)
Hg	217	2,7	5,4
Fluoranthène	1625	7,3	14,6
Benzo(a)Pyrène	21,1	4,5	9,0
PBDE 28	15,6	9,7	19,4
PBDE 47	14,9	4,8	9,6
PBDE 99	6,95	3,9	7,8
PBDE 100	6,97	3,9	7,8
PBDE 153	9,36	3,5	7,0
PBDE 154	9,51	4,2	8,4

Les incertitudes élargies obtenues pour les valeurs de référence de l'ensemble des analytes mesurés sont comprises entre 5 et 15 %.

4. Conclusion

Ce rapport s'inscrit dans l'étude que AQUAREF a conduit pour évaluer la faisabilité de produire un matériau de référence à matrice destiné à la réalisation de comparaisons inter laboratoires pour l'évaluation des performances des méthodes utilisées par les laboratoires et effectuer leur validation sur des matrices représentatives des matrices biotes.

L'étude s'est déroulée en trois étapes. En 2017 des essais préliminaires ont été effectués afin de maîtriser les phases de préparation du matériau qui peuvent être source de contamination et/ou de perte des substances et définir sous quelle forme le MR doit être distribué aux utilisateurs. En 2018, des expérimentations ont été conduites pour évaluer les cinétiques de bioaccumulation chez le gammare pour les substances visées [3].

En 2019, sept laboratoires experts ont participé à une comparaison interlaboratoires pour valider la faisabilité de produire à large échelle un MR et valider l'adéquation de ce MR par rapport à l'évaluation des capacités des laboratoires agréés à analyser ces substances dont les concentrations sont à des niveaux proches des NQE.

Au cours des trois étapes de l'étude il a été possible de s'assurer que le protocole mis au point pour la préparation des gammars est suffisamment reproductible pour permettre d'obtenir les concentrations ciblées pour les substances visées. En outre, le matériau est suffisamment homogène et stable pendant la durée de la comparaison interlaboratoires (1 mois) pour ne pas provoquer un impact significatif sur l'incertitude. Pour toutes les substances, des incertitudes élargies pour les valeurs de référence comprises entre 5 et 15 % ont été obtenues pour des concentrations proches des NQE.

Ces résultats ont donc permis de montrer qu'il est pertinent d'utiliser des gammars comme matrice pour la préparation de ce type de matériaux.

A terme, il serait donc envisageable de transférer cette méthodologie aux organisateurs d'essais d'aptitude (OCILs) afin de leur permettre de créer des matériaux d'essais à matrice répondant au plus haut critère de qualité et ainsi mettre en place les circuits d'essais d'aptitude indispensables aux respects des exigences de l'accréditation et de l'agrément. AQUAREF pourrait le cas échéant accompagner techniquement les OCIL comme cela a été fait pour d'autres transferts de CIL. En outre, la nécessité/possibilité de reconduire cette étude pour des substances critiques de la surveillance devra être envisagée à la suite des premières analyses des données de surveillance acquises par les Agences de l'eau.

5. Références bibliographiques

- 1 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
- 2 Circulaire Biote 2017 MTDD, 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 NOR : TREL1733991N
- 3 B. Lalere, C. Oster, C. Fallot, J. Cabillic, E. Alasonati, P. Fiscaro, O. Geffard, M. Coquery - Développement d'un outil de traçabilité chimique MRC (matériau de référence certifié)
- 4 ISO 17034:2016 Exigences générales pour la compétence des producteurs de matériaux de référence
- 5 CCQM Guidance note: Estimation of a consensus KCRV and associated Degrees of Equivalence; 2013 (https://www.bipm.org/cc/CCQM/Allowed/19/CCQM13-22_Consensus_KCRV_v10.pdf)
- 6 NF ISO 13528:2015 - Méthodes statistiques utilisées dans les essais d'aptitude par comparaison interlaboratoires
- 7 C. Rivier, M. Désenfant, M. Crozet, C. Rigaux, D. Roudil, B. Tufféry, A. Ruas. Use of an excess variance approach for certification of reference materials by interlaboratory comparison, Accred qual Assur (2014) 19:269-274, DOI 10.1007/s00769-014-1066-3.
- 8 M. Cox, P. Harris, S. Ellison. Use of an "excess-variance" approach for the estimation of a KCRV, associated standard uncertainty and DoEs for CCQM KCs; 2011; CCQM/11-18.
- 9 ISO GUIDE 35:2017 Matériaux de référence – Lignes directrices pour la caractérisation et l'évaluation de l'homogénéité et la stabilité

Remerciements

Les auteurs de ce report souhaitent remercier les laboratoires qui ont participé à l'essai interlaboratoires, sans lesquels cette étude n'aurait pas été possible.

IAEA : Emilia VASILEVA, Sabine AZEMARD, Inmaculada TOLOSA BERTRAL

LABERCA (ONIRIS/INRA) : Philippe MARCHAND, Vincent VACCHER, Bruno VEYRAND

IFREMER : Sylvette CROCHET, Joel KNOERY

IRSTEA : Ghislaine GRISOT

La Drôme (LDA26) : Floriane QUEIROGA, Philippe PLANEL, Anne-gaëlle VALADE

LNE : Carine FALLOT, Caroline OSTER

Université de Bordeaux (UMR EPOC 5808) : Émilie DASSIE, Pierre-Yves GOURVES, Régine MAURY-BRACHET

Annexe 1

Dans chaque tableau, les informations suivantes sont données :

Le code du laboratoire participant, le numéro (n) du flacon analysé, le nombre de prises d'essai pour chaque flacon (noté comme « n.1, n.2 quand plusieurs prises d'essais ont été analysées pour le même flacon), les résultats en µg/kg poids sec pour chaque prise d'essai (avec les nombres de répliquats si plusieurs répliquats par prise d'essai ont été fournis) et l'incertitude élargie (U, k=2) fournie par les laboratoires.

Tableau 3 : Mercure

Laboratoire	Flacon	Nombre de prises d'essai	Résultats (µg/kg p.s.)			U (k=2)
			Répliquat 1	Répliquat 2	Répliquat 3	
H1	3	3.1	178	174		10%
		3.2	160	167		
		3.3	173	176		
	20	20.1	194	196		
		20.2	162	162		
		20.3	182	175		
H2	10	10.1	231			15%
		10.2	212			
		10.3	220			
	17	17.1	215			
		17.2	225			
		17.3	223			
H3	1	1.1	192			6,41%
		1.2	233			
		1.3	220			
		1.4	212			6,81%
		1.5	212			
		1.6	230			
		1.7	209			
		1.8	235			
	21	21.1	235			6,41%
		21.2	241			

Laboratoire	Flacon	Nombre de prises d'essai	Résultats (µg/kg p.s.)			U (k=2)	
			Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 3		
H4	2	2.1	214			10%	
		2.2	202				
		2.3	212				
	11	11.1	245				
		11.2	210				
		11.3	221				
	14	14.1	218				
		14.2	210				
		14.3	212				
	22	22.1	221				
		22.2	230				
		22.3	265				
	6	6.1	200				20%
		6.2	201				
6.3		201					
6.4		209					
H5	4	4.1	228			14%	
		4.1	213				
		4.3	214				
	18	18.1	237				
		18.2	223				
H6	8	8.1	247			13%	
		8.2	244				
		8.3	277				
		8.4	209				
		8.5	238				
		8.6	220				
		8.7	216				
		8.8	280				
		8.9	291				
		8.10	252				
	16	16.1	235				
		16.2	229				
		16.3	214				
		16.4	210				
		16.5	230				
		16.6	251				
		16.7	250				
		16.8	250				

Tableau 4 : Fluoranthène

Laboratoire	Flacon	Nombre de prises d'essai	Résultats (µg/kg)			U
			Réplikat 1	Réplikat 2	Réplikat 3	
O1	5	5.1	2445			35%
	7	7.1	1925			
O2	12	12.1	1306	1330	1312	10%<U<45%*
		12.2	1400	1426	1432	
		12.3	1412	1399	1388	
	3	3.1	1184	1196	1194	
		3.2	1113	1115	1112	
		3.3	1261	1252	1237	
O3	14	14.1	1868			21%
	2					
	23	23.1	2034			
	9	9.1	1655			
O4	4	4.1	1305			22%
		4.2	1190			
		4.3	1281			
	10	10.1	1377			
		10.2	1351			
		10.3	1499			

Tableau 5 : Benzo(a)Pyrène

Laboratoire	Flacon	Nombre de prises d'essai	Résultats (µg/kg)			U
			Réplikat 1	Réplikat 2	Réplikat 3	
O1	5	5.1	21,78			35%
	7	7.1	17,51			
O2	12	12.1	29,0	27,9	27,0	10%<U<45%*
		12.2	30,9	34,7	33,9	
		12.3	29,5	30,6	30,6	
	3	3.1	16,0	16,3	15,4	
		3.2	26,6	28,0	27,3	
		3.3	26,2	25,7	25,3	
O3	14	14.1	25,74			19%
	2	2.1	20,80			
	23	23.1	23,04			
	9	9.1	22,05			
O4	4	4.1	16,89			22%
		4.2	19,15			
		4.3	18,12			
	10	10.1	19,60			
		10.2	19,28			
		10.3	17,17			

Tableau 6 : BDE 28

Laboratoire	Flacon	Nombre de prises d'essai	Résultats (µg/kg)			U
			Réplikat 1	Réplikat 2	Réplikat 3	
O1	15	15.1	8,18			20%
	18	18.1	7,91			
O2	12	12.1	14,10	14,8	14,3	10%<U<45%*
		12.2	15,00	16,7	16,5	
		12.3	14,70	14,0	13,3	
	3	3.1	14,50	13,3	14,4	
		3.2	14,00	15,0	15,8	
		3.3	15,80	16,3	16,1	
O3	14	14.1	20,28			11%
	2	2.1	20,23			
	23	23.1	19,07			
	9	9.1	18,74			
O4	4	4.1	15,98			22%
		4.2	14,75			
		4.3	15,23			
	10	10.1	15,71			
		10.2	15,91			
		10.3	16,45			

Tableau 7 : BDE 47

Laboratoire	Flacon	Nombre de prises d'essai	Résultats (µg/kg)			U
			Réplikat 1	Réplikat 2	Réplikat 3	
O1	15	15.1	13,43			64%
	18	18.1	13,38			
O2	12	12.1	13,1	13,9	15,0	10%<U<45%*
		12.2	15,2	17,3	15,4	
		12.3	13,7	14,8	12,9	
	3	3.1	13,1	13,9	15,0	
		3.2	15,2	17,3	15,4	
		3.3	13,7	14,8	12,9	
O3	14	14.1	16,07			11%
	2	2.1	16,99			
	23	23.1	15,46			
	9	9.1	15,87			
O4	4	4.1	12,60			22%
		4.2	11,06			
		4.3	11,32			
	10	10.1	11,96			
		10.2	11,72			
		10.3	12,92			

Tableau 8 : BDE 99

Laboratoire	Flacon	Nombre de prises d'essai	Résultats (µg/kg)			U
			Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 3	
O1	15	15.1	9,91			55%
	18	18.1	9,58			
O2	12	12.1	4,8	5,3	5,6	10%<U<45%*
		12.2	5,5	6,4	6,2	
		12.3	5,8	5,3	5,2	
	3	3.1	5,8	4,9	4,4	
		3.2	5,0	5,6	5,4	
		3.3	5,8	5,0	4,6	
O3	14	14.1	6,94			19%
	2	2.1	6,68			
	23	23.1	7,31			
	9	9.1	6,78			
O4	4	4.1	8,01			22%
		4.2	7,21			
		4.3	7,29			
	10	10.1	7,07			
		10.2	7,65			
		10.3	8,13			

Tableau 9 : BDE 100

Laboratoire	Flacon	Nombre de prises d'essai	Résultats (µg/kg)			U
			Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 3	
O1	15	15.1	8,31			37%
	18	18.1	7,54			
O2	12	12.1	6,4	7,1	7,1	10%<U<45%*
		12.2	7,2	8,6	8,6	
		12.3	7,5	8,2	7,6	
	3	3.1	6,0	6,9	6,9	
		3.2	7,2	6,7	7,6	
		3.3	8,0	7,2	7,2	
O3	14	14.1	7,24			20%
	2	2.1	5,97			
	23	23.1	6,70			
	9	9.1	6,55			
O4	4	4.1	8,34			22%
		4.2	7,55			
		4.3	7,65			
	10	10.1	7,72			
		10.2	8,07			
		10.3	8,95			

Tableau 10 : BDE 153

Laboratoire	Flacon	Nombre de prises d'essai	Résultats (µg/kg)			U
			Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 3	
O1	15	15.1	12,25			50%
	18	18.1	12,60			
O2	12	12.1	4,50	5,8	5,7	10%<U<45%*
		12.2	6,2	7,4	7,0	
		12.3	5,2	5,1	6,7	
	3	3.1	5,7	5,6	4,3	
		3.2	6,5	5,3	5,9	
		3.3	6,7	5,3	6,0	
O3	14	14.1	11,35			16%
	2	2.1	10,31			
	23	23.1	10,62			
	9	9.1	10,66			
O4	4	4.1	9,21			22%
		4.2	7,70			
		4.3	8,29			
	10	10.1	8,04			
		10.2	8,75			
		10.3	8,94			

Tableau 11 : BDE 154

Laboratoire	Flacon	Nombre de prises d'essai	Résultats (µg/kg)			U
			Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 3	
O1	15	15.1	12,24			56%
	18	18.1	12,23			
O2	12	12.1	4,2	4,4	5,9	10%<U<45%*
		12.2	6,0	7,5	5,7	
		12.3	6,2	7,7	4,5	
	3	3.1	9,1	6,4	6,0	
		3.2	4,4	5,6	7,5	
		3.3	7,5	7,0	4,6	
O3	14	14.1	11,80			22%
	2	2.1	10,58			
	23	23.1	10,07			
	9	9.1	11,02			
O4	4	4.1	9,12			22%
		4.2	8,11			
		4.3	8,49			
	10	10.1	8,02			
		10.2	8,53			
		10.3	8,81			

* Sans plus d'explications fournies par le laboratoire, c'est la valeur maximale de 45% qui a été retenue et utilisée pour l'estimation de l'incertitude de la valeur de référence

Annexe 2

Exemple d'évaluation de la stabilité : cas du Benzo(a)Pyrène.

Afin de juger de l'impact de la stabilité dans le temps, on a procédé au test statistique de Student de pente nulle.

3 analyses dans le temps (T0, T25 et T34 jours) avec plusieurs réplicats (3 flacons par point temporel) ont été effectuées.

Un modèle linéaire de type $Y = b_0 + b_1X$ a été choisi, avec b_0 = intercepte et b_1 = pente (Figure 10).

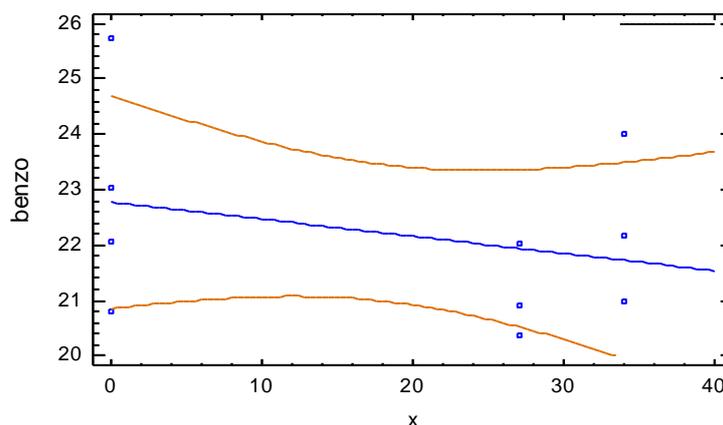


Figure 10. Etude de stabilité pour le Benzo(a)Pyrène. Analyse de 3 flacons à T0, T25 et T34 jours)

Un test ANOVA a été effectué. Les coefficients du test sont reportés dans le tableau 12 et l'analyse de variances dans le tableau 13.

Tableau 12. Coefficients du test ANOVA pour la molécule Benzo-a Pyrène

	<i>Estimation des moindres carrés</i>	<i>Erreur type</i>	<i>t</i>	<i>Probabilité</i>
Intercepte	22,7776	0,835218	27,2715	0,0000
Pente	-0,0309626	0,0351223	-0,88156	40,37 %

Tableau 13. Analyse des variances

Coefficient de corrélation	-0,297562
R-carré	8,85431 %
Estimation de l'écart-type du résidu	1,68664

On constate que la pente (-0,0309626) est non significativement différente de 0 avec le

test de Student effectué, comme le démontre la valeur de la probabilité (40,37%) qui est largement supérieure à 5% (c.à.d à un niveau de confiance de 95%).

La statistique de R-carré indique en outre que le modèle explique 8,85% de la variabilité pour le Benzo(a)Pyrène. Le coefficient de corrélation vaut -0,30, ce qui indique une relation relativement faible entre les variables. L'erreur-type d'estimation indique que l'écart-type des résidus est de 1,69.

On peut en conclure qu'il n'y a pas de variation statistiquement significative de la molécule Benzo(a)Pyrène avec le temps.

La même approche a été appliquée à toutes les substances et aucune variation statistiquement significative avec le temps n'a été observée.