

Synthèse du workshop Essais d'aptitude pour la matrice biote : harmonisation des pratiques pour des essais adaptés aux contextes réglementaires environnementaux et sanitaires

Béatrice LALERE et Sophie LARDY-FONTAN
Avec la collaboration de Marina COQUERY

Septembre 2019

Note de synthèse



Contexte de programmation et de réalisation

Cette synthèse a été réalisée dans le cadre du programme scientifique et technique AQUAREF pour l'année 2018, dans le cadre du thème « E » « Garantir la qualité des données bancarisées ».

Auteur (s) :

Béatrice LALERE
LNE
beatrice.lalere@lne.fr

Sophie LARDY-FONTAN
LNE
Sophie.lardy-fontan@lne.fr

Avec la participation de :
Marina Coquery
Irstea
Marina.coquery@irstea.fr

Vérification du document :

Christine FERAY
INERIS
Christine.FERAY@ineris.fr

Les correspondants

AFB : Gaëlle Deronzier, gaelle.deronzier@afbiodiversite.fr
Nicolas Gaury, nicolas.gaury@afbiodiversite.fr

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

Référence du document : Béatrice LALERE, Sophie LARDY-FONTAN - Synthèse du Workshop Essais d'aptitude pour la matrice biote : harmonisation des pratiques pour des essais adaptés aux contextes réglementaires environnementaux et sanitaires - Rapport AQUAREF 2018 - 17 p.

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>

1. Contexte et objectifs

Suite à la révision de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE, 2013/39/CE¹), la matrice biote est devenue une matrice incontournable des programmes de surveillance environnementaux, puisque cette révision renforce les exigences d'un suivi de plusieurs substances considérées comme persistantes, bioaccumulables et toxiques dans le biote pour le second cycle DCE 2016-2021.

A l'échelle nationale, la stratégie de surveillance, pour la métropole, de la matrice biote est décrite dans la note technique du 26 décembre 2017².

Le suivi dans la matrice biote s'applique aux substances suivantes :

- 11 substances prioritaires, parmi lesquelles 6 déjà présentes dans la liste des substances prioritaires du premier cycle DCE (2008/105/CE³) et 5 substances introduites par la directive 2013/39/UE¹ :
- auxquelles s'ajoutent le DEHP, des chloroalcanes et le pentachlorobenzène, pour lesquelles les normes de qualité environnementale (NQE) indiquées dans la directive se rapportent à l'eau. Néanmoins, les NQE eau ont été rétrocalculées sur la base de valeurs seuils écotoxicologiques établies pour le biote. C'est la raison pour laquelle ces substances sont incluses dans la stratégie nationale de suivi sur biote ;
- enfin, le chlordécone qui est un polluant spécifique de l'état écologique⁴ pour la Martinique et la Guadeloupe.

Selon les milieux et les paramètres, la surveillance pourra porter sur différentes matrices :

- En milieu continental : plusieurs espèces de poisson, soit le chevaine, le barbeau fluviatile, la brème commune, la perche et le gardon (filet) et des crustacés (Gammare) ;
- En milieu littoral : mollusques bivalves (moules et huitres)

Les tableaux ci-dessous présentent un résumé de la surveillance pour ces substances :

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 MTES Note technique du 26/12/17 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

³ Directive n° 2008/105/CE du 16/12/08 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

⁴ Arrêté du 27 juillet 2015 modifiant l'arrêté du 25 janvier 2010 relatif aux méthodes et critères d'évaluation de l'état écologique, de l'état chimique et du potentiel écologique des eaux de surface pris en application des articles R.212-10, R.212.11 et R.212.18 du code de l'environnement

SUBSTANCE chimique	SUBSTANCE dangereuse prioritaire	NQE BIOTE (µg/kg poids frais)	BIOTE AUQUEL la NQE se rapporte	NQE MA ¹ équivalente dans l'eau (µg/L)	NQE CMA (µg/L)
Hg	X	20	Poisson (entier)		0,07 (ESC et EL) ²
Hexachlorobenzène	X	10	Poisson (filet)		0,05 (ESC et EL)
Hexachlorobutadiène	X	55	Poisson (entier)		0,6 (ESC et EL)
PBDE (Σ BDE-28, 47, 99, 100, 153, 154)	Uniquement tétra, penta, hexa et hepta-BDE	0,0085	Poisson (filet)		0,14 (ESC) 0,014 (EL)
Acide perfluorooctane sulfonique (PFOS)	X	9,1	Poisson (filet)	6,5 × 10 ⁻⁴ (ESC) 1,3 × 10 ⁻⁴ (EL)	36 (ESC) 7,2 (EL)
HBCDD (somme des trois isomères)	X	167	Poisson (entier)	0,0016 (ESC) 0,0008 (EL)	0,5 (ESC) 0,05 (EL)
Dioxines et PCB de type dioxine (Σ 7 PCDD, 10 PCDF et 12 PCB-dl)	X	0,0065 TEQ ₂₀₀₅ ³	Poisson (filet) Crustacé Mollusque		s.o.
Heptachlore et époxyde d'heptachlore	X	6,7 × 10 ⁻³	Poisson (filet)	2 × 10 ⁻⁷ (ESC) 1 × 10 ⁻⁸ (EL)	3 × 10 ⁻⁴ (ESC) 3 × 10 ⁻⁵ (EL)
Fluoranthène		30	Crustacé Mollusque	0,0063 (ESC et EL)	0,12 (ESC et EL)
HAP à 5 et 6 anneaux					
Benzo[a]pyrène	X	5	Crustacé Mollusque	1,7 × 10 ⁻⁴ (ESC et EL)	0,27 (ESC) 0,027 (EL)
Benzo[b]fluoranthène	X				0,017 (ESC et EL)
Benzo[k]fluoranthène	X				0,017 (ESC et EL)
Benzo[g,h,i]perylène	X				8,2 × 10 ⁻³ (ESC) 8,2 × 10 ⁻⁴ (EL)
Indéno[1, 2, 3-cd]-pyrène	X				s.o.

SUBSTANCE chimique	SUBSTANCE dangereuse prioritaire	NQE BIOTE (µg/kg poids frais)	BIOTE AUQUEL la NQE se rapporte	NQE MA ¹ équivalente dans l'eau (µg/L)	NQE CMA (µg/L)
Dicofol	X	33	Poisson (entier)	1,3 × 10 ⁻³ (ESC) 3,2 × 10 ⁻⁴ (EL)	s.o.

1 NQE-MA : norme en concentration moyenne annuelle/NQE-CMA : norme en concentration maximum acceptable.
 2 ESC : eaux de surface continentales/EL : eaux littorales.
 3 TEQ : équivalents toxiques conformément aux facteurs de 2005 de l'Organisation mondiale de la santé.

SUBSTANCE chimique	SUBSTANCE dangereuse prioritaire	NQE BIOTE (µg/kg poids frais)	BIOTE AUQUEL la NQE se rapporte	NQE MA équivalente dans l'eau (µg/L)	NQE CMA (µg/L)
Chloroalcanes C10-13	X	16,6 × 10 ³	Poisson (entier)	0,4 (ESC et EL)	1,4 (ESC et EL)
DEHP	X	3,2 × 10 ³	Mollusque Crustacé	1,3 (ESC et EL)	s.o.
Pentachlorobenzène	X	367	Poisson (entier)	0,007 (ESC) 0,0007 (EL)	s.o.

NOM DE LA SUBSTANCE	CODE SANDRE	NQE MOYENNE ANNUELLE		
		Eaux douces de surface	Eaux côtière et de transition	Biote
Chlordécone	1136	0,1 µg/l	0,1 µg/l	20 µg/kg

De plus, certaines substances ont été retenues pour renseigner le descripteur 8 de la directive cadre stratégie pour le milieu marin (DCSMM)⁵. Pour ces substances, des NQE dans le biote, en plus de celles déjà citées, ont été définies :

- PBDE (congénères tri- à hexa-BDE (BDE-28, -47, -49, -99, -100, -153, -154), congénères tri- à déca-BDE (BDE-28, -47, -99, -100, -153, -154, -183, -197, -206, -207, -209)),
- PCB et dioxines et furanes (congénères CB28, CB52, CB101, CB118, CB138, CB153, CB180),
- HAP (Benzo(a)anthracène, chrysène, pyrène, phénanthrène),
- tétrabromobisphénol-A (TBBP-A),
- métaux (méthyle-mercure),
- tributylétain (TBT),
- pesticides organochlorés et métabolites (DDT et métabolites).

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.

Dans le cadre du dispositif de sécurisation sanitaire des aliments, la direction générale de l'alimentation (DGAL) pilote, chaque année, la mise en œuvre de plans de surveillance et de contrôle (PSPC). Ils visent à surveiller la contamination des productions primaires animale et végétale, des denrées alimentaires d'origine animale et de l'alimentation animale. Dans ce cadre, la surveillance de la qualité des produits de la pêche est instaurée depuis plusieurs dizaines d'années. La fiabilité de ces contrôles repose sur un réseau de laboratoires complexe (laboratoires de référence européens, laboratoires de référence nationaux, laboratoires agréés réalisant les contrôles officiels et laboratoires officiant en dehors des contrôles officiels) et des exigences de moyens et de performances adaptées à ces enjeux⁶.

⁵ Directive 2008/56/CE du Parlement Européen et du Conseil du 17 juin 2008 établissant un cadre d'action communautaire dans le domaine de la politique pour le milieu marin (directive-cadre stratégie pour le milieu marin)

⁶ <https://agriculture.gouv.fr/plans-de-surveillance-et-de-contrôle>

Que ce soit dans le domaine de la surveillance environnementale ou sanitaire, les laboratoires en charge des contrôles doivent être accrédités selon le référentiel NF EN ISO 17025 mais également justifier d'un agrément. Ainsi, par exemple, les laboratoires doivent évaluer les performances de leurs méthodes et effectuer les validations sur des matrices représentatives. Deux moyens principaux sont disponibles pour évaluer les performances d'une méthode : l'utilisation des matériaux de référence (certifiés) à matrice en privilégiant des matrices représentatives et la participation à des comparaisons inter laboratoires (CIL) dont les essais d'aptitude (EA).

Quelle fiabilité de cette évaluation des performances des méthodes d'analyse est-il possible d'attendre selon la qualité et la représentativité des matériaux de référence utilisés, que ce soit en termes de concentration ou de matrice ?

A l'heure actuelle, les normes qui encadrent le développement de matériaux de référence (NF EN ISO 17034⁷, guide ISO 35⁸) ou l'organisation des essais d'aptitude (NF EN ISO/IEC 17043⁹ et NF ISO 13528¹⁰) ne fixent aucune exigence sur la représentativité des matériaux de référence (MR), matériaux de référence certifiés (MRC), ou matériaux d'essais, par rapport au domaine d'application de la méthode. Seuls les critères d'homogénéité et de stabilité des matériaux sont pris en compte. De même, les réglementations ou référentiels existants (que ce soit dans le contrôle sanitaire ou environnemental) fixent peu d'exigences.

Dans ce contexte, le 18 janvier 2019, AQUAREF a organisé un workshop « *Essais d'aptitude pour la matrice biote : harmonisation des pratiques pour des essais adaptés aux contextes réglementaires environnementaux et sanitaires* » dont l'objectif était de favoriser le partage d'expériences entre les organisateurs d'essais d'aptitude, les développeurs de matériaux de référence, les acteurs de la surveillance environnementale et du contrôle sanitaire autour d'une problématique commune : les besoins d'outils du contrôle de la qualité adaptée à la surveillance de la matrice biote.

Ce rapport présente une synthèse des interventions de ce workshop ainsi que les faits marquants et les principales conclusions issus de la table ronde.

2. Programme du Workshop : Essais d'aptitude pour la matrice biote : harmonisation des pratiques pour des essais adaptés aux contextes réglementaires environnementaux et sanitaires

Le programme de la journée et la liste des participants à ce workshop sont joints en annexe de ce document.

⁷ NF EN ISO 17034 (2016-12-30) : Exigences générales pour la compétence des producteurs de matériaux de référence

⁸ FD ISO GUIDE 35 (2018-03-07) : Matériaux de référence - Lignes directrices pour la caractérisation et l'évaluation de l'homogénéité et la stabilité

⁹ NF EN ISO/IEC 17043 (2010-04-01) : Évaluation de la conformité - Exigences générales concernant les essais d'aptitude

¹⁰ NF ISO 13528 (2015-10-23) : Méthodes statistiques utilisées dans les essais d'aptitude par comparaisons interlaboratoires

Ce workshop sur invitation, a réuni les laboratoires de référence français (AQUAREF, ANSES, LABERCA) organisant des Comparaisons Inter-Laboratoires (CIL), des Organismes de Comparaisons Inter-Laboratoires (OCIL) français (AGLAE et BIPEA), des laboratoires internationaux (IRMM et IAEA) et des institutionnels (AFB et DEB). En tout 18 personnes ont pu participer et présenter leurs études et travaux.

L'ensemble des présentations est disponible sur le site Aquaref :

<https://www.aquaref.fr/essais-aptitude-matrice-biote-harmonisation-pratiques-essais-adaptes-aux-contextes-reglementaires-en>

3. Synthèse des interventions

3.1 Introduction

La journée est ouverte par Sophie Vaslin-Reimann qui présente AQUAREF et ses missions, présentation complétée par Sophie Lardy-Fontan qui rappelle le contexte et objectifs du workshop.

Olivier Gras (DEB) précise les éléments de contexte du suivi des substances chimiques dans le biote au titre de la DCE, notamment la transposition en France des exigences de la Directive 2013/39/CE. Cette présentation est suivie et complétée par une intervention de **Nicolas Gaury** (AFB) sur le cadre de l'agrément environnement et son application dans le biote. A ce jour, l'agrément vise 144 paramètres dans 3 matrices biote selon l'avis du 14 avril 2018 déterminant les LQ¹¹. Il précise que les laboratoires qui réalisent ces analyses devront être titulaires de l'agrément des laboratoires effectuant des analyses dans le domaine de l'eau et des milieux aquatiques, et ainsi répondre aux mêmes exigences que pour les autres matrices de la surveillance (eau/sédiment), à savoir :

- être accrédités selon la norme NF EN ISO/CEI 17025 par une instance d'accréditation pour ce paramètre dans la matrice considérée ;
- respecter les limites de quantification listées dans l'avis en vigueur relatif aux limites de quantification des couples « paramètre-matrice » de cet agrément ;
- appliquer pour l'analyse de ce paramètre dans la matrice considérée une méthode permettant de garantir une incertitude élargie de mesure qui soit inférieure ou égale à 50 % au niveau de 3*LQ ;
- participer au moins 2/an, pour la méthode d'analyse appliquée à des essais interlaboratoires (répondant aux exigences de la norme NF EN ISO/CEI17043) réalisés en France ou dans un autre état membre, dont 1 essai n'excédera pas 15*LQ.

La présentation se clôt avec la question suivante « Est-ce que ces EIL sont adéquats pour la surveillance BIOTE ? ».

3.2 Retour d'expérience des producteurs de matériau de référence

Marina Ricci du JRC-GEEL introduit les enjeux du workshop avec une présentation sur la question de représentativité des matériaux de référence certifiés biote, présentant les

¹¹ JORF n°0087 du 14 avril 2018, texte n° 159 : Avis relatif aux limites de quantification des couples «paramètre-matrice» de l'agrément des laboratoires effectuant des analyses dans le domaine de l'eau et des milieux aquatiques

méthodologies qui sont déployées au sein du JRC. Les points saillants de cette présentation sont les suivants :

- pour la production de matériaux de référence biote : il n'existe ni approche «unique» ni «meilleure absolue» ;
- les avantages et les limites de chaque approche doivent être analysés au cas par cas. Et c'est sur cette base que la décision est prise ;
- une planification minutieuse est toujours une "règle d'or".

Imma Tolosa de l'IAEA (Monaco) partage son retour d'expérience sur les procédures de préparation des matériaux de référence et d'essais d'aptitudes pour les composés organiques dans les matrices biote. La présentation illustre les challenges pour répondre au besoin de matériaux de référence à matrice biote dont les concentrations sont proches de celles du milieu marin pour les programmes de surveillance et d'évaluation des risques pour l'environnement (niveaux de concentration des Persistent Organic Pollutants (POP) existants et émergents aux faibles concentrations, de l'ordre du $\mu\text{g kg}^{-1}$ et ng kg^{-1}). La présentation se conclut sur les nouveaux enjeux à prendre compte :

- Dans le domaine agro-alimentaire, les résultats doivent être normalisés par le taux de lipides introduit une nouvelle composante dans la variation des données car il y a de grandes variations sur le pourcentage de mesures de lipides ;
- les nouvelles stratégies de traitement des échantillons et leurs possibles impacts sur la dégradation des contaminants organiques émergents (irradiation gamma, pression et température, antioxydants) ;
- Les composés non détectés par les laboratoires experts et rapportés par les participants sont considérés comme de faux positifs. Comment traiter ces données ? Faut-il les inclure dans l'évaluation de la performance des laboratoires ?
- Et enfin la mise en place de la traçabilité métrologique par les participants.

3.3 Retour d'expérience des OCIL français

Les deux OCIL **BIPEA** et **AGLAE** qui proposent des essais d'aptitude (EA) dans le domaine de la surveillance environnementale, ouverts aux laboratoires français et européens, rappellent les contraintes technico-économiques de développement et d'organisation de ce type de circuits d'aptitude notamment si l'on considère les niveaux à cibler et la spécificité des matrices.

Eric Ziegler présente, pour les paramètres ciblés par la surveillance biote, les circuits d'aptitude qui sont au catalogue du **BIPEA**. Bien que peu d'essais soient, à l'heure actuelle, disponibles (adéquation support/fraction/niveau), le BIPEA précise qu'il ne devrait pas y avoir de difficultés pour certains paramètres. Au contraire pour certains, comme par exemple le mercure, les LQ à atteindre semblent déjà représenter un verrou majeur. En effet, la LQ agrément est de $6 \mu\text{g/kg}$, et les essais d'aptitude organisés actuellement proposent des matériaux dont la concentration varie entre 100 et $1\,000 \mu\text{g/kg}$. Les points saillants/significatifs de cette présentation sont les suivants :

- l'objectif d'un EIL est d'évaluer la performance d'un laboratoire donc de sa justesse ;
- les échantillons doivent être adaptés à l'objectif de l'essai d'aptitude en termes de présence et de niveau concentration des molécules ;
- pour le biote, les besoins devront être précisés (fréquence/matrice ; niveaux cibles de concentrations ; nombre de laboratoires potentiels) ;
- il est de la responsabilité de l'OCIL de définir les options de dopage des matrices biote avec leurs avantages et inconvénients.

Philippe Guarini a présenté le retour d'expérience d'**AGLAE** sur un matériau naturellement contaminé (Muscle de poisson gras). En effet, les administrateurs du réseau et les experts des commissions techniques ont statué contre la matrice dopée sur la base de leur connaissance de la littérature, de leur expérience technique et d'observations faites lors de CIL. Des CIL ont donc été développés sur des matrices naturellement contaminées dès 2009.

Pour soutenir cette position, un retour d'expériences sur le développement de CIL sur la chlorophylle a et l'indice phéopigments dans les eaux naturelles est présenté. Il a démontré qu'il est primordial d'utiliser des matériaux naturellement contaminés pour des CIL. En effet, pour ces deux analytes, il a été observé que :

- il existe des écarts entre les résultats des rendements d'extraction selon les solvants utilisés (le solvant spécifié (l'acétone) n'est pas le plus efficace)
- le solvant même le plus efficace parmi ceux testés n'extrait pas à 100%
- pour les analytes, c'est bien le fait d'être dans la cellule qui limite l'extraction de la molécule.

Ces essais sur matrices naturellement contaminées, si techniquement très positifs, ont dû être arrêtés car non viables économiquement, dans le contexte actuel où cette approche n'est pas obligatoire. AGLAE est donc en attente de directives des autorités sur la question du choix entre matériaux naturellement contaminés et matrices dopées. Dans cette attente, AGLAE ne prévoit pas de proposer des essais sur matrices dopées, qu'elle juge non représentatives.

3.4 Retour d'expérience des laboratoires de référence

Michel Laurentie fait part de l'expérience de l'**ANSES** et du laboratoire de Fougères sur la préparation de matériaux naturellement contaminés pour la réalisation de CIL dans le cadre de ses missions de laboratoires de référence. Le laboratoire est accrédité NF ISO 17043 depuis 2010. Le contexte du contrôle des médicaments vétérinaires et de ses enjeux (très forts) est présenté ce qui permet de comprendre les stratégies choisies pour les CIL. En routine les analyses doivent être conformes aux règlements 2017/625 et 2002/657. Il y a deux types de substances : les substances autorisées, ayant des limites maximales de résidus (LMR) et les substances interdites. En conséquence, deux modes de CIL : CIL pour la détection (CIL qualitatif) et CIL pour la confirmation (CIL quantitatif, parfois qualitatif) sont organisées. Les points saillants de cette présentation sont les suivants :

- Les avantages du recours aux matériaux « naturellement » contaminés sont que ce sont **des échantillons proches des échantillons « terrains »**, les proportions naturelles entre produit actif et métabolites (selon espèces biologiques) sont respectées ; ce type de préparation permet d'avoir les composés (métabolites) non disponibles dans le commerce.
- Les inconvénients sont non négligeables : besoin d'installation et d'agrément pour conduire des expérimentations animales, besoin de connaissance en toxicocinétique des couples molécules/animaux étudiés, et les besoins inhérents aux capacités analytiques disponibles et rapides, sans oublier les coûts élevés.

Vincent Vacher fait part de l'expérience du **LABERCA** sur la question majeure de la définition et préparation de la matrice dans l'organisation d'un essai d'aptitude. Le LABERCA est le Laboratoire National de Référence pour les POP (dioxine/PCB-DL, PCB-NDL, PFAS, retardateurs de flamme bromés, ...), les HAP et les promoteurs de croissance. Le laboratoire est accrédité NF ISO 17043 depuis 2014. La présentation insiste sur le besoin impérieux de **définir en amont et en lien avec les objectifs de l'EIL, les points particuliers suivants** : composés d'intérêts (contaminants, composés

de migration,...), type de matrice (solide, liquide...), niveau de concentration, supplémentation ou non, incurred (volontairement contaminé d'une façon "naturelle" (expérimentation animale)), forme de l'échantillon (matrice entière, lyophilisée...), nombre de participants. Le LABERCA adapte ses stratégies en fonction de la faisabilité par exemple dans le cas des matrices de poisson :

Partie à analyser	Sous quelle forme envoyer	« Source » de contamination	Niveau de concentration
Si Règlement UE, on l'applique	Privilégier, poisson entier	Privilégier échantillon naturellement contaminé	Privilégier proche et < LMR
Sinon, à définir	Sinon, pâte broyée, mixée	Sinon incurred, Et enfin supplémentation (moins réaliste)	Envisager proche LOQ ou > LMR selon l'objectif

3.5 Retour d'expérience d'IFREMER

Emmanuel Ponzevera a présenté les activités du Laboratoire Biogéochimique des Contaminants Métalliques afin de donner le point de vue « utilisateur d'EIL ». Les activités concernent à la fois le volet sanitaire mais également le volet environnement, ce qui amène le laboratoire à participer à de nombreux EIL : AIEA, Quasimeme et ANSES.

Pour les métaux, le fait d'avoir des matrices biote dopées ou naturelles pose moins de problème que dans le cas des composés organiques car les attaques acides sont très agressives. Par contre, la participation à des EIL permet de mettre en évidence par exemple des problèmes de blanc. Pour ce type d'EIL, il existe un manque en termes de gamme de concentration et surtout d'isotopie des métaux.

3.6 Retour d'expérience d'AQUAREF

Béatrice Lalère et Marina Coquery ont rapidement présenté une étude de faisabilité d'un matériau de référence de gammars contaminés expérimentalement au laboratoire, en deux parties :

- effet de différentes méthodes de préparation du matériau de type « gammars » dont l'objectif est de définir sous quelle forme le matériau doit être distribué aux utilisateurs (i.e., frais ou lyophilisé, broyé ou non). Ceci est le pré-requis pour éviter toute contamination ou toute perte des analytes recherchés ;
- exposition de gammars en laboratoire dont l'objectif a été de connaître les cinétiques de bioaccumulation dans des conditions contrôlées (systèmes expérimentaux de type aquarium) pour les substances visées dans l'étude (c'est-à-dire des molécules pour lesquelles des NQE sont disponibles) : métaux (Hg), HAP (BaP et Fluoranthène) et PBDE (PBDE 28, PBDE 47, PBDE 99, PBDE 100, PBDE 153, PBDE 154). Ceci est le pré-requis pour pouvoir fixer un protocole de contamination reproductible des organismes et, de manière indirecte, de soutenir les enjeux liés à l'applicabilité de la surveillance en utilisant des gammars engagés exposés dans le milieu (évaluation des temps d'exposition optimaux). Les expérimentations ont été réalisées à Irstea. Le LNE a préparé les solutions de dopage et analysé les gammars.

Ces travaux ont permis de montrer qu'il est possible de produire un matériau de référence gammars et de définir le matériau (dopage, préparation avant envoi aux participants...). Lors de cette étude, il a été décidé d'exposer les gammars pendant 5 jours puis de les lyophiliser avant envoi aux laboratoires.

Cet essai est en cours de finalisation et les matériaux d'essai seront envoyés à des laboratoires pour vérification/validation de la méthodologie proposée.

4. Faits marquants et principales conclusions issus de la table ronde

Le Workshop organisé par AQUAREF a permis de progresser sur l'identification des bonnes pratiques et leur harmonisation notamment pour répondre aux besoins de disposer de circuits d'essais d'aptitude adaptés aux évolutions réglementaires dans les domaines de la surveillance environnementale et sanitaire. Ce workshop a permis des échanges croisés entre les producteurs de matériaux de référence et les OCIL qui doivent également produire des matériaux d'essais pour leurs CIL.

Les matériaux de référence à matrice sont caractérisés pour leur composition de constituants majeurs, mineurs ou à l'état de traces voire d'ultra-traces. Ces matériaux sont préparés à partir de matrices biote qui contiennent les composés d'intérêt, ou de manière synthétique en dopant une matrice biote avec les analytes d'intérêt. Ils sont généralement utilisés pour des études d'exactitude et d'incertitude via une utilisation par le laboratoire ou bien lors d'essais inter-laboratoires, ainsi que pour la surveillance des méthodes au cours du temps via les essais d'aptitude.

La norme NF EN ISO/CEI 17043 ne fixe aucune exigence forte sur la représentativité de matériaux d'essais mais précise certains points qui sont rappelés dans la note de bas de page ci-dessous.¹²

Les matériaux de référence doivent être le plus proche possible dans leur composition des matériaux habituellement analysés par les laboratoires, contenir les analytes d'intérêt, être disponibles à des quantités suffisantes et enfin être homogènes et stables dans le temps.

Pour disposer de tels matériaux, dans le cas du biote (organismes aquatiques), il est possible d'avoir recours à des :

- Matériaux naturellement contaminés
- Matériaux contaminés expérimentalement au « laboratoire » (*in vivo*) ;
- Matériaux dopés : ajout de composé à la matrice (l'organisme vivant n'est pas exposé à la contamination, le dopage est réalisé sur le matériau d'essai (ex : muscle de poisson))

Les matériaux naturellement contaminés sont les matériaux se rapprochant le plus des échantillons rencontrés par le laboratoire au quotidien. Mais, il est difficile de trouver dans

¹² paragraphe 4.4.2., il est précisé que : « Il convient que les entités soumises à l'essai d'aptitude correspondent autant que faire se peut, en termes de matrices, en termes de matrices, de mesurandes et de concentrations aux types d'entités ou de matériaux rencontrés en routine dans les essais ou l'étalonnage » et que « dans les programmes d'essais d'aptitude nécessitant que les participants préparent ou manipulent, ou préparent et manipulent, l'entité soumise à l'essai d'aptitude et la soumettent à l'organisateur d'essais d'aptitude, ce dernier doit émettre des instructions pour la préparation, le conditionnement et le transport de l'entité soumise à l'essai d'aptitude ».

l'environnement des matériaux dont les concentrations sur l'ensemble des analytes d'intérêt permettent de cibler des valeurs réglementaires, ou bien de trouver suffisamment de matériel afin de produire un MR en quantité suffisante.

Les matériaux contaminés expérimentalement au laboratoire sont également des matériaux se rapprochant des échantillons « réels » rencontrés par le laboratoire au quotidien dans le cadre des programmes de surveillance. Ils présentent de plusieurs avantages :

- Il est possible de disposer de matériaux avec des concentrations ciblées ;
- Toutes les molécules d'intérêt peuvent être présentes dans l'échantillon final ;
- L'espèce et l'âge des animaux peuvent être définis ;
- Pour la préparation de matériau en vue de la recherche de métabolites, il n'est pas obligatoire de disposer des métabolites qui pourraient ne pas être disponibles dans le commerce.

Mais le coût de leur production est élevé. En effet, pour réaliser une expérimentation animale, il est nécessaire d'avoir des installations adaptées ainsi que des agréments (...). Afin de définir au mieux la cinétique de métabolisation, il faut réaliser rapidement les analyses afin d'adapter au mieux les doses. De plus, lors de la production de tels matériaux, il est fréquent de faire face à des problèmes d'éthique.

Les matériaux dopés sont des matériaux dont la matrice peut être définie le plus proche possible des échantillons. Les concentrations et le nombre de contaminants « cible » sont aisément atteignables à des coûts abordables. Par contre, l'ensemble des participants s'est accordé pour rappeler que parfois, ils ne permettent pas de mettre en évidence certaines difficultés analytiques comme par exemple une extraction plus aisée de composés ajoutés à une matrice que le serait l'analyse de composés inclus à l'origine dans la matrice.

Un organisateur de comparaison interlaboratoires a rappelé que les participants à des CIL ne sont pas prêts à payer les essais un prix qui permettrait de couvrir les frais de matériaux naturellement contaminés.

Il est également proposé, lorsque les échantillons naturels ne présentent pas l'ensemble des molécules d'intérêt d'une CIL, de doper le matériau naturellement contaminé avec une solution contenant les molécules d'intérêt non présentes. Si cela permet lors des CIL de proposer aux laboratoires une large gamme de composés, ou la totalité des composés définis par la réglementation, il est néanmoins possible de se demander si certains analytes ne seront pas plus facilement « dosables » que d'autres.

Il a été également noté que lorsqu'un MR est réalisé en mélangeant deux matériaux, il sera nécessaire de s'assurer d'une bonne homogénéité de ce nouveau matériau. De ce fait, une attention particulière doit être apportée lors de l'élaboration d'un MR composite afin d'obtenir un matériau le plus homogène possible.

Un MR est caractérisé par rapport à une prise d'essai pour réaliser l'analyse. Il faudra donc aussi porter une attention particulière car souvent les prises d'essais nécessaires à l'analyse sont différentes entre le MR et le matériau réel.

Pour des questions de stabilité, de transport..., il est courant que le matériau subisse une étape de préparation telle que par exemple une lyophilisation ou un broyage. Or si les laboratoires travaillent habituellement sur des matériaux humides, le MR et donc l'EIL ne sera alors pas représentatif de l'ensemble du processus mis en œuvre par le laboratoire. Malheureusement, l'organisateur d'une CIL peut ne pas avoir d'autres solutions, mais il est important dans ce cas que l'organisateur souligne que cet essai n'est pas représentatif

de la totalité du processus. Par exemple, si le matériau de l'essai d'aptitude est lyophilisé, mais que les échantillons de biote soumis à l'analyse dans les laboratoires sont habituellement non lyophilisés, cet essai d'aptitude ne démontrera pas la capacité des laboratoires à lyophiliser les échantillons et l'innocuité de cette étape de préparation (risque de contamination pour certaines substances volatiles par ex).

5. Conclusion

Tout au long de cette journée, riche en échanges, les intervenants ont partagé leur expertise dans les différents domaines et il est apparu que :

- Les matériaux de référence biote naturellement contaminés sont les matériaux les plus adaptés, car ils permettent de se rapprocher au plus près des échantillons rencontrés en routine (analyses de surveillance biote DCE ou DCSMM) mais il semble très difficile, voire impossible, d'en obtenir pour tous les couples paramètres/matrices ;
- Les matériaux de biote contaminés au laboratoire permettent d'obtenir des matériaux également proches de ceux rencontrés en routine, mais leur fabrication est parfois coûteuse et peut poser des problèmes éthiques.
- Les matériaux de biote dopés présentent l'avantage de fournir des matériaux dont les concentrations peuvent être précisément ciblées, et sont moins coûteux ; mais ils ne permettent pas systématiquement de pouvoir évaluer les performances de la méthode ainsi que toutes les difficultés que le chimiste analyticien est susceptible de rencontrer, en particulier pour les substances organiques, lors des étapes de préparation telles que l'extraction et des étapes de quantification (effets mélanges de composés et interactions avec la matrice).

C'est donc généralement un équilibre entre les enjeux et/ou le besoin de validation de la méthode et/ou la démonstration de l'aptitude, et la rentabilité de l'organisation des CIL qui définissent le type de matériaux mis en œuvre dans les essais interlaboratoires et pour la fabrication de MRC pour la matrice biote.

Essais d'aptitude pour la matrice biote : harmonisation des pratiques pour des essais adaptés aux contextes réglementaires environnementaux et sanitaires

A la suite de la révision de la Directive 2013/39/CE, de sa transposition en droit français, la matrice biote est devenue une matrice importante des programmes de surveillance environnementaux. Elle soulève de nombreuses questions méthodologiques et techniques et notamment des questions métrologiques. Pour chaque substance ou famille de substances, la directive fixe une NQE (Norme de Qualité Environnementale) sur un biote pertinent (poisson entier ou filet, mollusques, crustacés). Chaque année, dans le cadre du dispositif de sécurisation sanitaire des aliments, la direction générale de l'alimentation (DGAL) pilote la mise en œuvre de plans de surveillance et de contrôle (PSPC). Ils visent à surveiller la contamination des productions primaires animale et végétale, des denrées alimentaires d'origine animale et de l'alimentation animale. Dans ce cadre, la surveillance de la qualité des produits de la pêche est instaurée depuis plusieurs dizaines d'années. La fiabilité de ces contrôles repose sur un réseau de laboratoires complexe (laboratoires de références européens, laboratoires de référence nationaux, laboratoires agréés réalisant les contrôles officiels et laboratoires officiant en dehors des contrôles officiels) et des exigences de moyens et de performances adaptées à ces enjeux.

Que ce soit dans le domaine de la surveillance environnementale ou sanitaire, les laboratoires en charge des contrôles doivent être accrédités selon le référentiel NF EN ISO 17025 mais également justifier d'un agrément. Ainsi, par exemple, les laboratoires doivent évaluer les performances de leurs méthodes et effectuer les validations sur des matrices représentatives. Deux moyens principaux sont disponibles pour évaluer les performances d'une méthode : l'utilisation des matériaux de référence (certifiés) à matrice en privilégiant des matrices représentatives et la participation à des comparaisons interlaboratoires (CIL) dont les essais d'aptitude (EA).

Quelle fiabilité de cette évaluation des performances méthodes selon la qualité et la représentativité des matériaux de référence utilisés que ce soit en termes de concentration ou de matrice. A l'heure actuelle, les normes qui encadrent le développement de matériaux de référence (Guide ISO 17034, guide ISO 35) ou l'organisation des essais d'aptitude (NF EN ISO/CEI 17043 et NF ISO 13528) ne fixent aucune exigence sur la représentativité des matériaux de référence (RM) ou matériaux d'essais par rapport au domaine d'application de la méthode. Seuls les critères d'homogénéité et de stabilité des matériaux sont pris en compte. De même, les réglementations ou référentiels existants (que ce soit dans le contrôle sanitaire ou environnemental) fixent peu d'exigences,

Ce workshop a pour objectif de favoriser le partage d'expériences entre les organisateurs d'essais d'aptitude sur la matrice biote, les acteurs de la surveillance environnementale et du contrôle sanitaire. Il permettra de progresser sur l'identification des bonnes pratiques et leur harmonisation notamment pour répondre aux besoins de disposer de circuits d'essais d'aptitude adaptés aux besoins des contextes réglementaires environnementaux et sanitaires.

AQUAREF

Consortium
scientifique
et technique

BRGM, IFREMER,
INERIS, Irstea et LNE

Programme

Avec le soutien de :
**AGENCE FRANÇAISE
POUR LA BIODIVERSITÉ**
ÉTABLISSEMENT PUBLIC DE L'ÉTAT



9h30-10h - Olivier GRAS (DEB) et Nicolas GAURY (AFB): enjeux /besoins pour surveillance DCE : agréments

C. FERAY : AQUAREF

Sophie LARDY-FONTAN : objectifs de la journée

10h00-10h25 - Marina Ricci (JRC-Geel) : Representativeness of biota Certified Reference Materials: recent developments at JRC-Geel

10h25-10h50 - Vincent VACCHER, Philippe MARCHAND (LABERCA) : Définir et préparer la matrice: un point majeur dans l'organisation d'un essai d'aptitude.

10h50- 11h15 - Michel LAURENTIE (ANSES) : Préparation de matériaux naturellement contaminés pour la réalisation de CIL, expérience de l'Anses, Laboratoire de Fougères

11h15-11h30 - Pause

11h30-11h55 - Philippe GUARINI (AGLAE) : Expérience d'AGLAE avec du matériau naturellement contaminé : un échec pour des raisons bassement commerciales

11h55-12h20 - Eric ZIEGLER (BIPEA) : Essais aptitudes existants pour le contrôle sanitaire et environnement

12h20-13h30 - Pause déjeuner

13h30-13h55 - Imma TOLOSA (IAEA) : Procedures and challenges to prepare reference materials and proficiency testing for organic contaminants in biota matrices at IAEA-EL,

13h55-14h20 - Emmanuel PONZEVERA - IFREMER (AQUAREF) : Analyses de métaux trace dans les organismes marins: méthodes, MRC et essais d'aptitude Quasimeme

14h20-14h45 - Marina COQUERY, Béatrice LALERE (AQUAREF - Irstea/LNE) : Développements d'un MR Gammarets pour la surveillance des eaux continentales

14h45-15h00 - Pause

15h00-16h30 - Table ronde : Echanges sur bonnes pratiques, représentativité (matrice, niveau concentration) et méthodes préparation des matériaux.

- Animation : Sophie LARDY-FONTAN et Marina COQUERY - AQUAREF

16h30-16h45 - Conclusion

Liste des personnes présentes

A. ASSOUMANI, AQUAREF-INERIS
M. COQUERY, AQUAREF-Irstea
P. FISICARO, AQUAREF-LNE
N. GAURY, AFB
O. GRAS, DEB
P. GUARINI, AGLAE
B. LALERE, AQUAREF-LNE
S. LARDY-FONTAN, AQUAREF-LNE
C. LAURENT, BIPEA
M. LAURENTIE, ANSES
P. MARCHAND, LABERCA
E. PONZEVERA, AQUAREF-IFREMER
M. RICCI, IRMM
E. ROZUEL, AQUAREF-IFREMER
I. TOLOSA, IAEA
V. VACCHER, LABERCA
S. VASLIN-REIMANN, AQUAREF-LNE
E. ZIEGLER, BIPEA