



Méthodologie de détermination d'un facteur de bioaccumulation (BAF) sur les mollusques en milieu marin.

BAF opérationnel déterminé dans le contexte DCE

Amouroux Isabelle et Sire Alizée

Ifremer

Juillet 2016

Les co-auteurs

Isabelle Amouroux

Ingénieur Analyse Risque Chimique en milieu marin

Cellule ARC

Isabelle.Amouroux@ifremer.fr

Ifremer Nantes - Rue de l'Île d'Yeu - BP 21105 - 44311 Nantes cedex 3

Et

Alizée Sire

Ingénieur chimie marine

Cellules ARC et ROCCH

Alizee.Sire@ifremer.fr

Ifremer Nantes - Rue de l'Île d'Yeu - BP 21105 - 44311 Nantes cedex 3

Les correspondants

Onema : Olivier Perceval, DAST

Référence du document : Ifremer, RBE/BE/ARC/2016.10

Nous tenons à remercier toutes les personnes qui ont contribué à l'élaboration de cette méthodologie par leur appui technique, organisationnel et/ou pour la relecture, correction de ce document.

Jean François Chiffolleau, Ifremer, ROCCH

Anne Grouhel, Ifremer, Coordinatrice ROCCH

Céline Tixier, Ifremer, Responsable du Laboratoire Biogéochimie des Contaminants Organiques

Jean-Louis Gonzalez, Ifremer, Chercheur Laboratoire Biogéochimie des Contaminants Métalliques

Tiphaine Chouvelon, Ifremer, Chercheur Laboratoire Biogéochimie des Contaminants Métalliques

Bruno Andral, Ifremer, Coordinateur DCE

Florence Menet-Nedelec, Ifremer, Ingénieur, LER Normandie

Frank Maheux, Ifremer, LER Normandie

Mélissa Dallet, INERIS, Ingénieur Analyse Risque Chimique en milieu marin

Document validé par :

Thierry Burgeot, Ifremer, responsable Unité Biogéochimie et Ecotoxicologie

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>

Méthodologie de détermination d'un facteur de bioaccumulation (BAF) sur les mollusques en milieu marin. BAF opérationnel déterminé dans le contexte DCE.

Co-auteurs : Amouroux I. et Sire A.

Table des matières

Préambule	6
Introduction.....	7
1. Stratégie d'acquisition du facteur de bioaccumulation (BAF).....	8
1.1. Principes généraux	8
1.2. Stratégie générale	10
1.3. Caractéristiques de la mesure de la concentration dans les moules.....	12
1.4. Caractéristiques de la mesure de la concentration dans l'eau	13
1.4.1. Point technique et réglementaire	13
1.4.2. Quelle fraction analyser ?.....	15
1.4.3. Quels échantillonneurs passifs utiliser ?	17
2. Protocole d'acquisition des données	19
2.1. Localisation des points d'étude.....	19
2.2. Quelles méthodes valides pour les substances étudiées ?	20
2.3. Déroulement de l'étude	25
2.4. Prélèvements.....	27
2.5. Paramètres complémentaires de suivi.....	29
2.6. Analyses.....	30
3. Traitement et interprétation des résultats	37
4. Budget	38
Documents de référence.....	40

Méthodologie de détermination d'un facteur de bioaccumulation (BAF) sur les mollusques en milieu marin. BAF opérationnel déterminé dans le contexte DCE.

Co-auteurs : Amouroux I. et Sire A.

Résumé

Suite à une étude conduite en 2015 par la cellule d'Analyse du Risque Chimique (ARC) en milieu marin en collaboration avec le Réseau d'Observation de la Contamination Chimique (ROCCH), 23 Valeurs Guides Environnementales (VGE) ont été déterminées pour les mollusques en alternative aux Normes de Qualité Environnementales (NQE) eau définies dans la DCE 2013/39/UE. Le passage d'une valeur à l'autre nécessite l'emploi de facteurs de conversion : facteur de bioaccumulation (BAF) et/ou facteur de bioconcentration (BCF). De façon préférentielle et selon le Technical Guidance for Deriving Environmental Quality Standards (EC, 2011), ce sont les valeurs de BAF déterminées sur le terrain qui doivent être prioritairement utilisées ; à défaut les valeurs de BCF seront employées : BCF expérimentaux, puis BCF calculés par la méthode QSAR.

La bioaccumulation est définie comme l'accumulation nette d'un contaminant chimique dans un organisme suite à son absorption *via* toutes les sources environnementales (eau, sédiment et nourriture). De ce fait, une valeur de BAF ne peut être déterminée qu'en milieu naturel où l'ensemble des voies de contamination et d'excrétion de la substance étudiée seront prises en compte. A l'heure actuelle, il n'existe aucune norme précisant la méthodologie d'acquisition d'une valeur de BAF sur le terrain. L'objectif principal de ce document est donc de proposer, pour 28 substances hydrophobes et bioaccumulables de la DCE 2013/39/UE, un cadre méthodologique permettant l'acquisition de valeurs de BAF opérationnels et valides sur la base d'essai « terrain ». Pour ce faire, ce document se présente en deux parties. La première permet de fixer les principes généraux du BAF et de définir la stratégie générale d'acquisition de ces valeurs sur le terrain. La deuxième partie correspond au protocole technique et organisationnel de la phase d'acquisition des données établie pour la période 2016-2018. Pour chacun des points de suivi prévus, est précisé le déroulement de l'acquisition des données (matrice, substances, période) ainsi que les différents intervenants du prélèvement au traitement des données.

Au terme de cette étude, et suivant les résultats obtenus, il est prévu de déterminer différents BAF pour les mollusques avec selon les substances étudiées : BAF total, BAF référence et/ou BAF calculé par échantillonneur passif). Pour les composés du TBT, il ne sera toutefois pas possible de déterminer de BAF (absence de mesure de concentration dans l'eau et mollusque dans le cadre de cette étude). Ces valeurs seront déterminées par façade et pour chacun des points de suivi.

Mots-clés :

Facteur de bioaccumulation (BAF) ; Directive cadre sur l'eau ; Eau ; Mollusques ; Moules ; Valeurs Guides Environnementales (VGE) ; Milieu marin.

Méthodologie de détermination d'un facteur de bioaccumulation (BAF) sur les mollusques en milieu marin. BAF opérationnel déterminé dans le contexte DCE.

Co-auteurs : Amouroux I. et Sire A.

Synthèse opérationnelle

En 2015, une étude visant à déterminer des Valeurs Guides Environnementales (VGE) pour les mollusques qui soient aussi protectrices que les Normes de Qualités Environnementales (NQE) définies dans l'eau a été conduite par la cellule d'Analyse des Risques Chimiques (ARC) en milieu marin en collaboration avec le Réseau d'Observation de la Contamination Chimique (ROCCH). Le passage d'une valeur à l'autre nécessite l'utilisation de facteurs de conversion ; à faible niveau trophique ($NT = 2$ pour les mollusques) uniquement les facteurs de bioaccumulation (BAF) et de bioconcentration (BCF) doivent être employés. Selon le Technical Guidance Document (EC, 2011), si plusieurs valeurs valides de BAF et de BCF sont disponibles pour une même substance chimique, la valeur de BAF doit être préférée à celle de la valeur de BCF.

Etant donné que la bioaccumulation est définie comme l'accumulation nette d'un contaminant chimique dans un organisme *via* toutes les sources environnementales possibles (eau, sédiment et nourriture), seul le BAF peut être déterminé en milieu naturel par la mise en parallèle des concentrations en contaminants mesurés simultanément dans l'eau et dans les moules. Néanmoins, compte tenu de la variabilité du milieu marin et de l'évolution en continu des niveaux de concentration des différents contaminants, il paraît indispensable de définir un cadre méthodologique en vue d'acquiescer des valeurs de BAF sur le terrain. Actuellement des normes sont définies pour l'acquisition de valeurs de BCF en laboratoire, mais aucune n'est disponible pour l'acquisition de BAF terrain.

Le présent document a donc pour objectif de proposer une méthodologie pour déterminer des valeurs de BAF en milieu naturel qui soient opérationnels dans un contexte DCE. A terme, la détermination de ces valeurs permettra de calculer des VGE mollusques alternatives et au moins aussi sensibles que les NQE définies dans l'eau. Ce travail est réalisé pour une liste de 28 substances chimiques (24 composés organiques et 4 métaux) qui sont présentes dans l'annexe I de la DCE 2013/39/UE et qui sont caractérisées comme hydrophobes et bioaccumulables.

Dans un premier temps, les principes généraux de la détermination du BAF sur le terrain sont définis, permettant ainsi de faire le point sur la validité de ces valeurs et sur les différents BAF qu'il est possible de calculer : $BAF_{référence}$ basé sur la concentration du contaminant dans la fraction libre dissoute de l'eau et BAF_{total} déterminé à partir de la concentration du contaminant dans la fraction totale de l'eau. Par la suite, la stratégie générale d'acquisition des données en milieu naturel est définie. Le BAF implique de disposer, au niveau d'un même point de suivi et simultanément, de résultat à la fois sur la matrice eau et sur la matrice moules. Les concentrations en contaminants dans l'eau (fraction brute et dissoute à $0,45 \mu m$) sont mesurées en utilisant les méthodes analytiques classiques ou *via* les échantillonneurs passifs (SBSE, membrane silicone et DGT). Pour la recherche des contaminants dans les moules, on utilise les moules sauvages et les moules encagées. Un point

technique et réglementaire sur les caractéristiques des mesures de la concentration dans l'eau et dans les moules est alors effectué.

Dans un deuxième temps, le protocole d'acquisition des données en milieu naturel est défini. Les points de suivi sont sélectionnés pour 3 des 4 sous régions marines de la Directive Cadre Stratégie sur le Milieu Marin (DCSMM) en fonction des niveaux de contamination. Les méthodes d'analyse de la matrice « eau » selon les substances chimiques étudiées sont également déterminées. Le déroulement de l'étude en fonction que l'on considère les moules sauvages ou les moules encagées est aussi décrit. Enfin, le circuit de transmission des échantillons est défini et les différents intervenants sont identifiés.

Dans une troisième partie, le traitement et l'interprétation des résultats sont définis. Au terme de l'étude, il sera alors possible de déterminer différentes valeurs de BAF selon les matrices analysées (eau brute, eau filtrée) et des méthodes d'analyses employées (analyse classique, ou sur extraits d'échantillonneurs passifs) : BAF_{total} , $BAF_{référence}$, $BAF_{SBSE\ total}$, $BAF_{SBSE\ dissous}$, BAF_{DGT} ou $BAF_{DGT\ Hg}$ et $BAF_{membrane\ silicone}$. Pour les composés du TBT, aucune valeur de BAF terrain ne pourra être déterminée étant donné qu'aucune acquisition de données dans l'eau et/ou dans les moules ne peut être réalisée dans le cadre de cette étude.

Préambule

En 2015, une étude¹ visant à déterminer des Valeurs Guides Environnementales (VGE) pour les mollusques qui soient aussi protectrices que les Normes de Qualités Environnementales (NQE) définies dans l'eau pour 25 substances hydrophobes et bioaccumulables de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) 2013/39/UE² a été conduite par la cellule d'Analyse des Risques Chimiques (ARC) en milieu marin en collaboration avec le Réseau d'Observation de la Contamination Chimique (ROCCH).

A faible niveau trophique (NT = 2), la transposition d'une valeur de NQE eau à une valeur de VGE mollusques nécessite l'utilisation de facteurs de conversion : facteurs de bioconcentration (BCF) et facteur de bioaccumulation (BAF) qui peuvent être déterminés suivant différentes méthodologies. De façon préférentielle et selon le Technical Guidance for Deriving Environmental Quality Standards ou TGD-EQS (EC, 2011), ce sont les valeurs de BAF déterminées sur le terrain qui doivent être prioritairement utilisées ; à défaut les valeurs de BCF seront employées : BCF expérimentaux, puis BCF calculés par la méthode QSAR.

¹ Sire A., Amouroux I., 2015. Détermination de Valeurs Guides Environnementales (VGE) mollusques alternatives aux Normes de Qualités Environnementales (NQE) eau définies dans la DCE.

² Directive 2013/39/UE du Parlement européen et du Conseil du 12/08/2013 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.

Introduction

Pour un organisme aquatique, la bioaccumulation est le processus qui permet l'augmentation de la concentration d'une substance chimique dans ses tissus en comparaison à la concentration de cette même substance dans l'eau environnante, via toutes les voies d'exposition possible : eau/sédiments et ingestion de nourriture (Mackay et Fraser, 2000). Selon le TGD-EQS (EC, 2011), le facteur de bioaccumulation (BAF) est considéré comme la combinaison du facteur de bioconcentration (BCF), qui représente l'accumulation par un organisme d'une substance chimique uniquement via l'eau et du facteur de bioamplification (BMF), qui représente l'accumulation par un organisme d'une substance chimique via la nourriture. Le BMF sera alors dépendant de la complexité de la chaîne trophique (eau douce ou eau marine) et de la position de l'organisme étudié dans la chaîne alimentaire. De ce fait, il peut être calculé selon l'équation suivante :

$$BAF (L.Kg^{-1}) = BCF \times \prod_{i=1}^n BMF$$

La détermination d'un BCF de qualité ne peut se faire qu'en laboratoire, puisqu'en bassin d'essai il est possible de maîtriser les sources de contamination des organismes (dans ce cas, uniquement par l'eau), ainsi que les différents paramètres environnementaux et la concentration en contaminant présente dans l'eau. De ce fait, des normes ont été développées pour différents organismes (poissons et mollusques en particulier), ce qui permet de fixer un cadre méthodologique. A contrario, si une mesure de contaminant est réalisée sur un organisme prélevé directement en milieu marin, celle-ci ne peut qu'être la résultante de l'ensemble des voies de contamination et d'excrétion de la substance étudiée, ainsi c'est une valeur de BAF qui sera déterminée (et non une valeur de BCF). Néanmoins, aucune méthodologie n'existe pour l'acquisition d'une valeur de BAF sur le terrain. Ce présent document a donc pour objectif de définir un cadre méthodologique permettant l'acquisition de BAF opérationnels et valides sur la base d'essai « terrain » pour les substances hydrophobes et bioaccumulables dans un contexte appliquée à la DCE 2013/39/UE.

Les mollusques ont la capacité de concentrer les contaminants hydrophobes et bioaccumulables présents dans le milieu environnant, ce qui fait d'eux de bons indicateurs des niveaux de pollution du milieu étudié. La concentration en contaminants plus élevée dans les tissus des organismes que dans l'eau, facilitent les manipulations des échantillons et les analyses. Les mollusques sont également utilisés comme des matrices intégratrices pour le suivi de la contamination du milieu marin, permettant ainsi de s'affranchir des fluctuations rapides de celle-ci et d'appréhender l'état de contamination chronique du milieu. Dans le cadre de ce présent document, **ce sont les moules (*Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis*) qui seront utilisées**. Selon les lignes directrices OSPAR (2012), ces organismes sont caractérisés comme espèce de premier choix pour la surveillance dans le milieu marin, car elles sont présentes dans les eaux peu profondes et sur la presque totalité des côtes métropolitaines françaises.

1. Stratégie d'acquisition du facteur de bioaccumulation (BAF)

1.1. Principes généraux

Les facteurs de bioaccumulation doivent être déterminés individuellement pour chacune des substances étudiées. Dans le cas de substances en mélange, il est nécessaire de quantifier chacun des produits chimiques composant le mélange (US EPA, 2009).

Pour une substance donnée, un BAF valide doit être déterminé une fois **l'état d'équilibre atteint**. Pour un niveau de concentration donné dans l'eau, l'état d'équilibre est considéré atteint lorsque les phases d'accumulation et d'élimination d'une substance chimique dans un organisme sont égales (ASTM, 2013a). Le BAF mesuré à l'état d'équilibre correspond à la concentration de la substance chimique dans les moules divisée par la concentration de cette même substance dans l'eau durant la même période de temps :

$$\text{À l'équilibre : } BAF (L.Kg^{-1}P.H.) = \frac{C_{mollusque}}{C_{eau}}$$

Le BAF s'exprime sur le poids humide de tissus des organismes : en $L.kg^{-1} P.H.$.

La particularité de ce facteur tient au fait qu'il associe une mesure intégrée de concentration en contaminant dans un organisme qui représente une accumulation dans le temps, à une mesure instantanée de concentration en contaminant dans l'eau qui est potentiellement très variable et dépendante de plusieurs paramètres environnementaux. Une variation d'un microgramme de la substance dans l'eau, pour une concentration dans le mollusque de l'ordre de $0,1 \mu g.kg^{-1} P.H.$ peut induire une variation de BAF d'un facteur 2.

A cela, il faut également rajouter et prendre en compte la cinétique d'accumulation des substances dans les moules qui peut varier suivant la substance considérée (comportement de la substance dans le milieu et niveau de concentration), les paramètres environnementaux du milieu, l'espèce étudiée (*M.edulis* ou *galloprovincialis*) et l'état physiologique des organismes. Ce qui implique que **le BAF « terrain » est une valeur instantanée qui peut être extrêmement variable.**

Aussi est-il nécessaire de fixer un certain nombre d'éléments pour fiabiliser au mieux l'acquisition de cette valeur de BAF et dans une démarche pragmatique de l'adapter au mieux au contexte qui nous intéresse ici, à savoir la détermination de VGE mollusques sur certaines substances de la DCE. **Le BAF étant extrêmement variable, l'étude proposée ici vise à définir un facteur de conversion qui permettra de déterminer une VGE mollusque alternative et au moins aussi sensible que la NQE définie dans l'eau.**

L'US EPA a développé en 2000 une méthodologie pour dériver les critères de qualité de l'eau pour la protection de la santé humaine (US EPA, 2003 et US EPA, 2009). Dans ce cadre, l'US-EPA identifie deux types de BAF : un **BAF « total »** (BAF_{total}) et un **BAF « ligne de base »** ou « référence » ($BAF_{référence}$).

Le BAF_{total} peut être utilisé pour l'ensemble des composés et correspond à une mesure de BAF site spécifique. Il est calculé par le ratio entre la concentration totale du contaminant dans les tissus

appropriés des organismes ($C_{\text{organisme}}$), et la concentration totale de ce même contaminant dans l'eau environnante au niveau du point de suivi ($C_{\text{eau brute}}$). La concentration totale du contaminant dans l'eau inclut le contaminant associé au carbone organique particulaire, au carbone organique dissous et à la fraction libre dissoute.

$$BAF_{\text{total}} = \frac{C_{\text{organisme}}}{C_{\text{eau brute}}}$$

Le BAF_{total} est exprimé en $L.kg^{-1}$ P.H. et est dépendant du niveau trophique étudié.

Le $BAF_{\text{référence}}$ est calculé en réalisant le ratio entre la concentration du contaminant dans les tissus appropriés des organismes et normalisée par rapport au taux de lipides (C_l), et la concentration en contaminant dans l'eau dans la fraction libre dissoute ($C_{\text{eau libre dissoute}}$) dans des situations où l'organisme et sa nourriture sont exposés aux contaminants avec un ratio relativement constant au fil du temps. La fraction libre dissoute correspond au contaminant dissous dans l'eau, en excluant les contaminants adsorbés sur le carbone organique dissous et particulaire. La fraction libre dissoute d'un contaminant est considéré comme la forme la plus biodisponible des composés organiques dans l'eau et par conséquent, la forme qui reflète au mieux la bioaccumulation d'une substance chimique dans un organisme.

$$BAF_{\text{référence}} = \frac{C_l}{C_{\text{eau libre dissoute}}}$$

Le $BAF_{\text{référence}}$ est exprimé en $L.kg^{-1}$ de lipides et est dépendant du niveau trophique étudié. Il peut être converti en BAF_{total} pour permettre d'évaluer la qualité de l'eau au site considéré.

Pour les composés organiques non ioniques hydrophobes, l'utilisation d'un $BAF_{\text{référence}}$ présente l'avantage de prendre en compte les relations thermodynamiques qui influencent sur la biodisponibilité et la bioaccumulation de ces contaminants, et facilite la comparaison avec des valeurs BAF déjà disponibles pour d'autres écosystèmes. Le $BAF_{\text{référence}}$ permet également, du fait de la normalisation des concentrations en contaminants par rapport au taux de lipides et à l'utilisation de la fraction libre dissoute, de réduire la variance du BAF entre les sites d'études et les niveaux trophiques considérés. Pour les composés hydrophobes qui s'accumulent majoritairement dans les fractions lipidiques des tissus, la normalisation des résultats en fonction des taux de lipides est indispensable pour obtenir une valeur de BAF de qualité. De plus, pour ces substances, l'expression d'un BAF sur la fraction libre dissoute ($BAF_{\text{référence}}$) permet de réduire la variabilité des valeurs de $BAF_{\text{référence}}$ en comparaison aux BAF_{total} qui sont déterminés pour le même site d'étude. Les composés organiques non ioniques hydrophobes sont présents dans la fraction libre dissoute de l'eau et également en association avec le carbone organique dissous et particulaire ($\text{Log } K_{ow} > 5,5$) (US EPA, 2009).

La détermination de BAF pour les composés métalliques diffère de celle pour les composés organiques puisque la normalisation des concentrations en contaminants dans les tissus des organismes par rapport aux teneurs en lipides n'est pas nécessaire pour ces composés. De plus, leur biodisponibilité dans l'eau tend à être « substance-spécifique », la fraction libre dissoute de l'eau ne représente donc pas nécessairement la fraction la plus biodisponible (US EPA, 2000).

1.2. Stratégie générale

Les substances prioritaires de l'état chimique (Directive 2013/39/UE), ciblées pour l'acquisition de BAF sont les substances hydrophobes ($\text{Log Kow} > 3$) et bioaccumulables ($\text{BCF} > 2\,000 \text{ L.kg}^{-1} \text{ P.H.}$), elles sont listées dans le tableau 1. L'acquisition des données de BAF portent prioritairement sur les 25 substances hydrophobes et bioaccumulables qui disposent uniquement de NQE définies dans l'eau. Néanmoins, l'acquisition de données en vue de déterminer un BAF valide peut également être réalisée pour d'autres substances, même si ces certaines disposent déjà de NQE biote. La démarche sera notamment conduite pour trois substances supplémentaires : les diphényléthers bromés (NQE biote = $0,0085 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ P.H.}$), le mercure et ses composés (NQE biote = $20 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ P.H.}$) et le nickel, soit au total 28 substances (ou groupes de substances).

N° DCE	N° CAS	Substance	Famille	Législation	Rejet dans l'environnement
2	120-12-7	Anthracène	HAP	autorisation avec restrictions	toute l'année
5	32534-81-9	Diphényléthers bromés	Poly Bromo Diphényles Ethers (PBDE)	autorisation avec restrictions	toute l'année
6	7440-43-9	Cadmium et ses composés	Métal	autorisation	toute l'année
7	85535-84-8	Chloroalcanes, C10-13	Hydrocarbures alogénés	interdit (2003)	-
8	470-90-6	Chlorfenvinphos	Insecticide	interdit (2007)	-
9	2921-88-2	Chlorpyrifos	Insecticide	autorisé (depuis 2006)	mars à juin
9 bis	X	Pesticides cyclodiennes	Insecticide	interdit	-
9 ter	X	DDT total	Insecticide	interdit (1971)	-
12	117-81-7	Di(2-ethylhexyle)phthalate	Phtalate	autorisation avec restrictions	toute l'année
14	115-29-7	Endosulfan	Insecticide	interdit (2008)	-
18	608-73-1	Hexachlorocyclohexane	Pesticide	interdit (1998)	-
20	7439-92-1	Plomb et ses composés	Métal	autorisation avec restrictions	toute l'année
21	7439-97-6	Mercure et ses composés	Métal	autorisation avec restrictions	toute l'année
22	91-20-3	Naphtalène	HAP	autorisation avec restrictions	toute l'année
23	7440-02-0	Nickel	Métal	autorisation	toute l'année
24	84852-15-3	Nonylphénols (4-nonylphénol)	Alkylphénols	autorisation avec restrictions	toute l'année
25	140-66-9	Octylphénols (4-(1,1,3,3-tétraméthylbutyl)-phénol)	Alkylphénols	autorisation	toute l'année
26	608-93-5	Pentachlorobenzène	Chlorobenzène	interdit (2002)	-
27	87-86-5	Pentachlorophénol	Fongicide	interdit (1994) Dérogrations pour les installations industrielles	-
30	36643-28-4	Composés du tributylétain (tributylétain-cation)	Pesticide et antifouings	interdit (1982)	-
31	12002-48-1	Trichlorobenzène	Chlorobenzène	autorisation avec restrictions	toute l'année
33	1582-09-8	Trifluraline	Herbicide	interdit (2008)	-
36	124495-18-7	Quinoxifène	Fongicide	autorisé (depuis 2004)	mars à août
38	74070-46-5	Aclonifène	Herbicide	autorisé (depuis 2009)	octobre - novembre mars - juin
39	42576-02-3	Bifénox	Herbicide	autorisé (depuis 2009)	mars - juin
40	28159-98-0	Cybutryne (Irgarol)	Pesticide et antifouings	autorisé	toute l'année
41	52315-07-8	Cyperméthrine	Insecticide	autorisé (depuis 2006)	mars à septembre
45	886-50-0	Terbutryne	Pesticide	interdit (2003)	-

Tableau 1 : Description des 28 substances étudiées (ACTA, 2015 ; European Commission, 2016).

La détermination du BAF implique de disposer, au niveau d'un même point de suivi et simultanément, de résultats à la fois sur la matrice eau et sur la matrice biote (moules), une fois que l'état d'équilibre est atteint (figure 1). Les données de concentration dans les mollusques peuvent être acquises soit en utilisant des moules sauvages (populations indigènes), soit en utilisant des moules transplantées (moules en cages) provenant d'un site de référence. La recherche de certaines substances potentiellement présentes à l'état d'ultra traces dans la matrice eau marine selon la méthode « classique » (échantillonnage et analyse d'eau fraction dissoute ou totale) s'avère particulièrement délicate à mettre en œuvre tant dans la partie échantillonnage que dans la partie analyse. L'acquisition

des données de concentration dans l'eau pour une substance donnée, pourra donc s'appuyer selon le cas sur une analyse « classique » sur des échantillons d'eau ponctuels (eau brute ou filtrée), sur une analyse des échantillons par la technique SBSE (eau brute ou filtrée) ou sur l'utilisation d'échantillonneurs passifs intégratifs (DGT et membrane silicone) déployés « in situ » pendant une période de temps donnée.

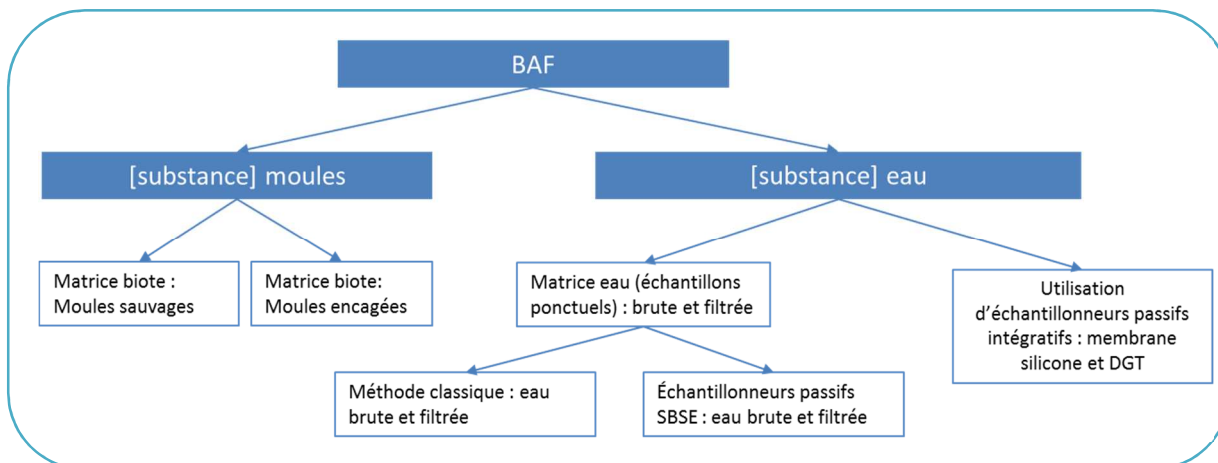


Figure 1: Méthodologie générale d'acquisition de BAF « terrain »

La période d'échantillonnage du ROCCH évolue à partir de 2017, il sera uniquement réalisé au premier trimestre de chaque année permettant ainsi de mutualiser la surveillance réalisée à vocation environnementale et sanitaire. Il n'y aura ainsi plus d'échantillonnage au cours du trimestre 4, échantillonnage qui permettait de répondre aux recommandations OSPAR (OSPAR, 2012) pour la surveillance environnementale. Ainsi de façon préférentielle, les données à acquérir seront autant que possible acquise au cours du premier trimestre, permettant ainsi de les faire coïncider avec les aspects opérationnels de la surveillance DCE.

Pour définir des VGE mollusques alternatives aux NQE eau, il faut se situer à des niveaux de concentration dans l'eau aussi proches que possible de la valeur de la NQE eau (Directive 2013/39/UE) pour la substance considérée. Dans le milieu marin, et pour la majorité des substances un tel niveau de concentration ne peut être atteint a priori que dans les estuaires. Néanmoins, ce sont des lieux éminemment instables avec des niveaux de concentration très variables et fluctuants au rythme des marées. Ils ne constituent donc pas, en première approche, les meilleurs candidats pour la détermination de BAF « terrain » puisqu'un des préalables importants à la détermination de BAF concerne la stabilité des niveaux de concentration dans l'eau.

L'acquisition d'un BAF « terrain » pour les substances sélectionnées est programmée sur **3 des 4 sous-régions marines** définies par la Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (DCSMM) : Manche mer du Nord, Golfe de Gascogne et Méditerranée occidentale.

1.3. Caractéristiques de la mesure de la concentration dans les moules

A contamination égale du milieu, les concentrations en contaminants chimiques dans les coquillages varient de façon importante en fonction des saisons. L'échantillonnage des moules sauvages et les essais de caging doivent donc être réalisés au cours de **la période de repos sexuel des organismes** (ASTM, 2013b ; OSPAR, 2012 ; US EPA, 2009). En fonction des espèces de moules (*Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis* et *Mytilus sp.*) et de leur localisation géographique, la maturité sexuelle n'intervient pas à la même période de l'année. Pour la Manche Mer du Nord et le Golfe de Gascogne où l'on rencontre principalement des populations de *Mytilus edulis*, la période de repos sexuel est le trimestre 4 (octobre, novembre et décembre), c'est à cette période que le prélèvement de moules doit être préférentiellement effectué (OSPAR, 2012). Pour la façade Méditerranéenne où l'on retrouve des populations de *Mytilus galloprovincialis*, la période de repos sexuel et donc d'échantillonnage peut varier en fonction des années. Selon Andral et ses co-auteurs (Andral *et al.*, 2004) elle se situe en juillet – août, alors que la période estimée par Boucart et Lubert (Boucart et Lubert, 1964) varie de juillet à mi-septembre.

Le prélèvement de moules sauvages ne peut pas être effectué sur l'ensemble des côtes françaises métropolitaines du fait de l'absence ou de la rareté des gisements dans certains secteurs géographiques, et principalement en méditerranée (Sargian et Andral, 2013 ; Andral *et al.*, 2007). Les expériences de caging se sont donc développées dans ces zones, d'une part, pour palier à l'absence de populations indigènes ; et d'autre part, car ces expériences permettent de combiner le contrôle expérimental des essais réalisés en laboratoire avec le réalisme des expériences pratiquées sur le terrain. La norme ASTM E2122-02 (ASTM, 2013b) : standard guide for conducting in-situ field bioassays with caged bivalves a été développée en 2002 (et révisée en 2013) afin de définir un cadre méthodologique pour la mise en place d'essai de caging sur le terrain en utilisant les bivalves. Le Réseau Intégrateurs Biologiques (RINBIO), actif en méditerranée, utilise les transplants de moules depuis 1996 pour suivre les niveaux de contamination de cette façade maritime. Un guide méthodologique pour ces expériences RINBIO a également été rédigé par Bruno Andral (Andral, 2002).

Afin de déterminer un BAF valide il est indispensable que **l'état d'équilibre soit atteint**. L'atteinte de cet état va être conditionné, d'une part, par le contaminant (caractéristiques physico-chimiques et concentration initiale dans le milieu) et d'autre part, par l'organisme étudié (notamment son état de santé, sa capacité à métaboliser, éliminer ou stocker la substance chimique). Le phénomène de bioaccumulation est lent ce qui nécessite plusieurs mois de présence des coquillages sur le site pour que leurs concentrations en contaminant en devienne représentative (Belin *et al.*, 2015 ; RNO, 2006). Pour les moules sauvages, elles doivent avoir au minimum 6 mois de présence sur le site (Claisse, 2012). En ce qui concerne les moules encagées, les organismes sont transplantés d'un site pas ou très peu contaminé à un site contaminé ; la cinétique d'accumulation d'un contaminant dans ces organismes est représentée sur la figure 2. Dans un premier temps, cette cinétique d'accumulation est caractérisée par une entrée rapide et massive du contaminant dans l'organisme, ce qui induit une augmentation linéaire de la concentration en contaminant dans la chair des organismes. L'organisme

absorbe alors la substance chimique à une vitesse plus grande que celle avec laquelle il l'excrète. Dans un second temps, une diminution du flux d'entrée du contaminant dans l'organisme est observée, le flux d'entrée égale alors le flux de sortie et la balance nette du procédé de bioaccumulation devient nulle. La concentration du contaminant dans la chair de l'organisme a atteint un état d'équilibre, la moule se trouve donc dans un état d'équilibre avec son milieu environnant. Cette cinétique d'accumulation est identique quelle que soit la substance chimique étudiée puisque le processus reste globalement le même quelle que soit la nature du contaminant (Casas, 2005).

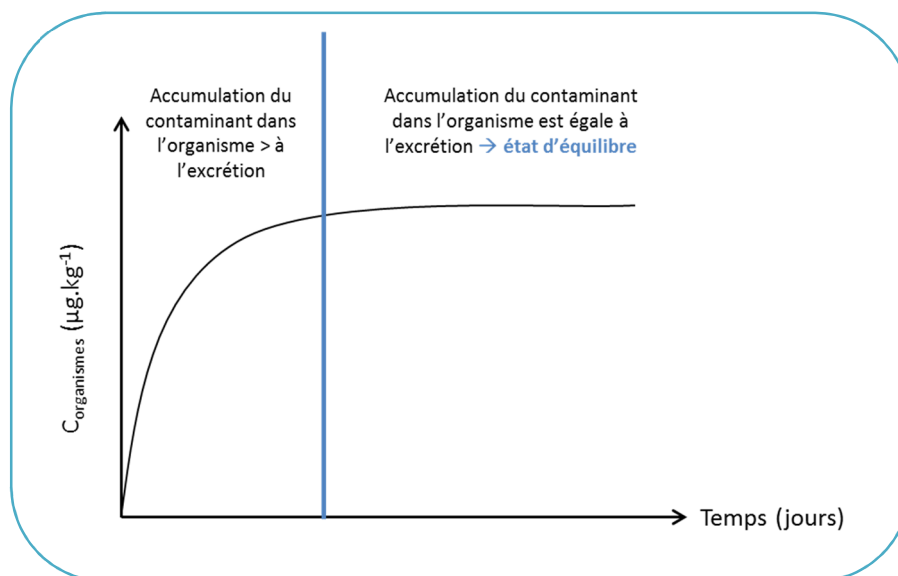


Figure 2 : Cinétique d'accumulation du contaminant dans les moules engagées

Dans le cadre de cette étude, les substances chimiques recherchées (tableau 1) sont des métaux et des composés organiques de poids moléculaire inférieur à 700 g.mol^{-1} . Pour atteindre l'état d'équilibre, la période d'immersion recommandée pour ces contaminants est de 3 mois. Si en plus d'un suivi de la contamination dans les tissus des organismes, un suivi des effets était souhaité, il serait alors nécessaire de poursuivre le test pendant 60 à 90 jours supplémentaires (ASTM, 2013b).

1.4. Caractéristiques de la mesure de la concentration dans l'eau

1.4.1. Point technique et réglementaire

Les contaminants chimiques, dissous ou particuliers, sont le plus souvent présents dans les eaux marines à l'état de traces ou d'ultra-traces. La première difficulté pour la détermination des niveaux de concentrations en contaminants dans cette matrice est de prélever et de conditionner des échantillons d'eau indemnes de toute modification de leur concentration initiale (contamination additionnelle ou disparition de composés volatils) (Amouroux et Claisse, 2015). La deuxième difficulté réside dans la faible représentativité spatiale et temporelle des échantillons ponctuels d'eau. En effet, une mesure ponctuelle peut être hautement variable en fonction des conditions météorologiques (par exemple, remise en suspension de contaminants présents dans les sédiments suite à une tempête) et des

conditions physico-chimiques du milieu ambiant, notamment la salinité en milieu estuarien (Casas, 2005).

Pour les composés organiques non ionique, tels qu'étudiés dans ce document, la forme libre dissoute est considérée comme représentant la forme la plus biodisponible et ainsi correspond à la forme la plus facilement bioaccumulable pour les organismes présents dans le milieu. Le document technique sur le développement de facteurs de bioaccumulation nationaux de l'US EPA (2003) souligne le fait que les substances chimiques (organiques hydrophobes et les composés métalliques) sont présentes dans l'eau sous trois formes/phases :

- libre dissoute ;
- liée aux particules en suspension (carbone organique particulaire) ;
- liée à la matière organique dissoute (carbone organique dissous).

La concentration totale de la substance dans l'eau peut donc être mesurée comme la somme de ces trois formes. La concentration en contaminant dissout, qui nous intéresse dans le cadre de cette étude, sera donc dépendante et corrélée aux concentrations de cette même substance en association avec le carbone organique dissous et particulaire qui sont présents dans la colonne d'eau échantillonnée. Néanmoins, dans le milieu les concentrations d'une substance associée au carbone organique dissous et particulaire sont supposées être en équilibre avec les concentrations de cette même substance sous forme libre dissoute. Par conséquent, tout ajout ou élimination d'une substance dans l'une de ces trois phases, induit un ré-équilibre de la concentration de la substance dans les deux autres phases. En raison de cet équilibre triphasique, la concentration de la substance chimique étudiée dans l'eau peut être exprimée sur la base de chacune de ces phases, de façon individuelle ou en combinaison, puisque cela donne une indication des concentrations de la substance dans les autres phases de la colonne d'eau.

Dans le cadre de la présente étude, les lieux recherchés doivent présenter autant que possible des niveaux de concentration relativement stables dans le temps et proches des valeurs NQE eau définies dans la directive 2013/39/UE. Néanmoins, il est difficile de faire coïncider ces deux éléments, puisque les niveaux de concentration rencontrés en milieu marin sont bien souvent inférieurs aux NQE eau voire aux limites de quantification (LQ) des méthodes utilisées. Les plus fortes concentrations sont rencontrées dans les estuaires, mais ces secteurs sont éminemment variables en termes de concentration de contaminant. Le recours à des méthodes classiques ne permettra donc pas d'avoir des valeurs suffisamment représentatives du milieu et requière l'utilisation d'échantillonneurs passifs intégratifs. Pour plus de renseignement, voir encadré « généralités sur les échantillonneurs passifs ».

Généralité sur les échantillonneurs passifs

D'après Mazella *et al.* 2011

« L'échantillonnage passif est une technique basée sur la diffusion (selon la première loi de Fick) de molécules présentes dans le milieu échantillonné vers une phase réceptrice après passage d'une barrière de diffusion (membrane, gel, couche d'eau statique) »

Un échantillonneur passif est constitué d'une phase réceptrice (liquide ou solide) emprisonnée dans une membrane, et présentant une affinité plus ou moins grande pour les substances chimiques recherchées. Les molécules présentes dans la colonne d'eau diffusent à travers la couche d'eau statique (couche limite ou interface eau-membrane) entourant l'échantillonneur. La membrane est l'élément principal responsable de la sélectivité de l'échantillonneur passif, soit par la taille des pores soit par ses interactions avec les composés (Poulier, 2014). L'ensemble du processus repose sur l'existence d'un gradient de concentration entre le milieu échantillonné et les différents compartiments de l'échantillonneur (couche limite d'eau, membrane, phase réceptrice), ce qui rend possible le transfert des molécules par simple diffusion, sans besoin d'une source d'énergie supplémentaire (figure 3). En fonction de la substance chimique étudiée, il existe plusieurs types d'échantillonneurs passifs.

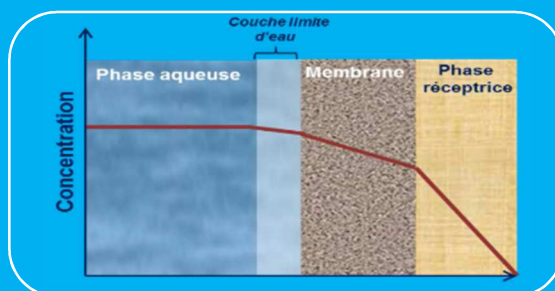


Figure 3 : Diffusion d'un contaminant donné dans les différents compartiments d'un échantillonneur passif (Mazzella *et al.*, 2011)

1.4.2. Quelle fraction analyser ?

Au niveau réglementaire, la Directive 2013/39/UE indique (article 9 bis point 6) que les NQE définies pour l'eau sont exprimées en concentrations totales dans l'échantillon d'eau entier. Par dérogation, les NQE pour l'eau concernant les métaux : cadmium, plomb, mercure et nickel, se rapportent à la concentration de matières dissoutes, c'est-à-dire à la phase dissoute d'un échantillon d'eau obtenu par filtration à travers un filtre de 0,45 μm ou par tout autre traitement préliminaire équivalent ou, moyennant indication, à la concentration biodisponible (DCE, 2013).

Néanmoins, le TGD-EQS (EC, 2011), précise (§ 2.11.3) que les NQE eau (déterminées sur la base d'essais expérimentaux en laboratoires et disposant ainsi de bas niveaux de carbone organique)

s'expriment préférentiellement en concentrations dissoutes. La fraction dissoute est à privilégier pour les contaminants organiques faiblement à modérément hydrophobes ($\text{Log } K_{ow} < 6$), alors que pour les composés organiques très hydrophobes ($\text{Log } K_{ow} > 6$) il peut être préféré une expression sur la fraction totale de l'eau. La majorité des substances étudiées ici (cf. tableau 1) présente un $\text{Log } K_{ow}$ inférieur à 6, excepté les PBDE pour lesquels le $\text{Log } K_{ow}$ est compris entre 4,28 (BDE 28) et 9,4 (BDE 154) (AQUAREF, 2010).

D'un point de vue technique, la fraction en contaminant dissous est obtenue après filtration d'un échantillon d'eau brute. Pour les métaux, la filtration est habituellement réalisée à $0,45 \mu\text{m}$ avec des filtres en polycarbonate (DCE, 2013). Cette filtration permet de prendre en compte les molécules présentes sous forme libre associées à des petits ligands organiques ou minéraux, et celles faiblement associées aux colloïdes et qui peuvent être remises en solution. Elle est considérée comme correspondant majoritairement aux fractions labiles de l'élément. Pour les composés organiques, une filtration à $0,7 \mu\text{m}$ (filtres Whatman® GF/F $0,7 \mu\text{m}$) est généralement utilisée dans la bibliographie (OSPAR, 2013 ; Bristeau, 2011 ; Tronczyński et al., 2005). Le choix de cette taille de filtre est dicté à l'origine par les gros volumes d'eau (de 10 L à 100 L) nécessaire pour analyser les contaminants organiques en milieu marin. Néanmoins, dans le cadre de cette étude des petits volumes d'eau sont analysés, il est donc possible d'utiliser des filtres en fibre de verre à $0,45 \mu\text{m}$ pour filtrer les composés organiques. Le seuil de coupure entre les métaux et les composés organiques est alors identique, ce qui permet une comparaison de ces substances à des fractions équivalentes.

Selon l'US EPA (2009), pour les composés organiques ayant un $\text{Log } K_{ow}$ supérieur à 4, les concentrations en carbone organique dissous (COD) et particulaire (COP) de l'eau peuvent être mesurées afin d'estimer la fraction libre dissoute pour une substance donnée (f_{fd}) en utilisant l'équation suivante :

$$f_{fd} = 1 / (1 + COP \times K_{ow} + 0,08 \times COD \times K_{ow})$$

En ce qui concerne les échantillonneurs passifs, dans le but d'interpréter les mesures obtenues avec ces outils, il est nécessaire de connaître les fractions échantillonnées qui dépendent des seuils de coupure de ces derniers (figure 4).

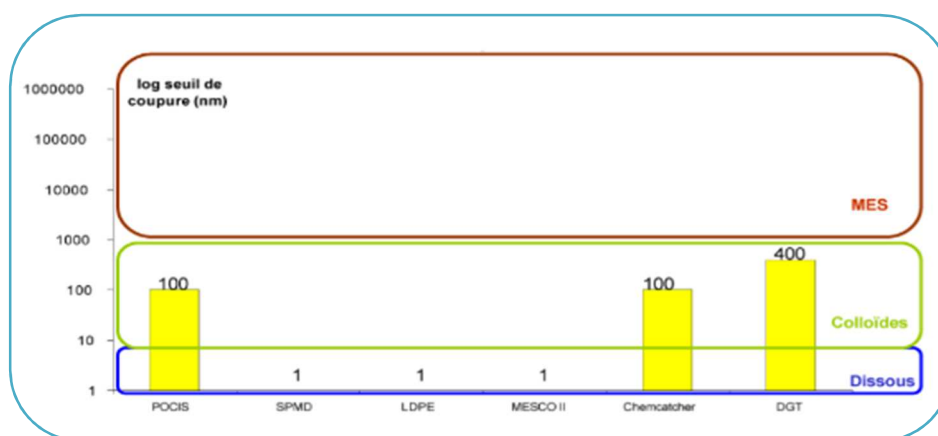


Figure 4 : Les seuils de coupure théoriques de différents échantillonneurs intégratifs (nm) et les seuils de fractionnement des différents compartiments de l'environnement (dissous, colloïdes et matières en suspension) (Poulier, 2014).

Les DGT permettent d'obtenir la concentration des métaux les plus « labiles » (les ions hydratés, les complexes minéraux et les petits complexes organiques), les POCIS et les Chemcatcher® permettent de mesurer des composés organiques polaires et non polaires qui sont présents dans la phase dissoute et sous forme de colloïdes de petite taille, tandis que les SPMD (Semi-Permeable Membrane Device), les LDPE (Low Density PolyEthylene) et les MESCO (Membrane-Enclosed Sorptive COating) II permettent d'analyser les concentrations des composés organiques hydrophobes présents en phase dissoute exclusivement (Gonzalez et Foan, 2015). En complément des échantillonneurs passifs (EP) représentés sur la figure 4, il existe d'autres types d'EP qui peuvent être employés pour mesurer les niveaux de contamination en milieu aquatique, et notamment les membranes en silicone. Ces membranes silicone permettent d'analyser exclusivement la fraction dissoute (Mazzella et *al.*, 2011). La fraction à analyser issue des échantillonneurs passifs ne correspond donc pas nécessairement à la fraction dissoute à analyser issue des prélèvements d'eau « classique ».

Néanmoins, les fractions mesurées par les EP ne sont actuellement pas définies avec précision et dépendent de (Poulier, 2014) :

- la taille de la molécule et de celle des pores de la membrane sélective ;
- l'affinité de la molécule avec la membrane ;
- la diffusion des substances à travers la couche limite d'eau (figure 3).

Des travaux sont actuellement menés par Aquaref pour permettre d'avancer sur la connaissance de l'utilisation des EP en vue d'une utilisation dans le cadre de surveillance DCE (Etude de déploiement grande échelle des échantillonneurs passifs).

Dans le cadre de cette étude, afin de répondre aux attentes techniques et réglementaire, l'acquisition des données dans la matrice eau sera faite autant que possible sur la fraction brute, sur la fraction dissoute et sur la fraction à analyser issues des EP.

1.4.3. Quels échantillonneurs passifs utiliser ?

Recherche des composés métalliques

Pour la mesure des composés traces métalliques dans le milieu marin, c'est l'utilisation des DGT (Diffusive Gradient in Thin film) qui est requise. L'utilisation de ces échantillonneurs passifs intégratifs (EIP) est adaptée à la surveillance DCE pour les métaux suivant : **Pb, Cd, As, Zn, Cr, Cu, Hg, Ni** (Miège et *al.*, 2014). Des DGT spécifiques sont nécessaires pour le **Hg et As**. Ils permettent de concentrer sur leur résine les ions hydratés, les complexes minéraux et les petits complexes organiques « labiles ». Seuls les cations métalliques dissous les plus « labiles » diffusent à travers le gel après un tri physique (porosité du gel à 5 nm – 1nm pour DGT « restrictifs ») et chimique (affinité des cations vis-à-vis de la résine et des ligands avec lesquels ils sont complexés).

Ces outils sont constitués d'un corps en Teflon sur lequel reposent successivement une phase spécifique des cations (chelex) ou des anions (ferrihydrite), un gel de diffusion (polyacrylamide, environ 0,8 mm d'épaisseur) et une membrane microporeuse de protection en polycarbonate ou en acétate de cellulose (diamètre des pores 0,45 μm) (figure 5). Le gel de diffusion étant suffisamment épais, il permet en théorie de négliger la couche limite d'eau (cf. figure 3). De ce fait, l'accumulation des substances dans le DGT est indépendante de la vitesse du courant (Poulier, 2014).

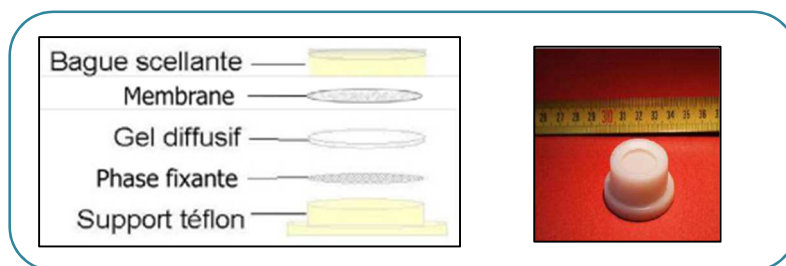


Figure 5 : Schéma et photo d'un DGT (Poulier, 2014)

Recherche des composés organiques hydrophobes

Pour les composés organiques hydrophobes, il existe plusieurs types d'échantillonneurs passifs en fonction de l'hydrophobicité du composé recherché (Mazzella et al., 2011) (figure 6).

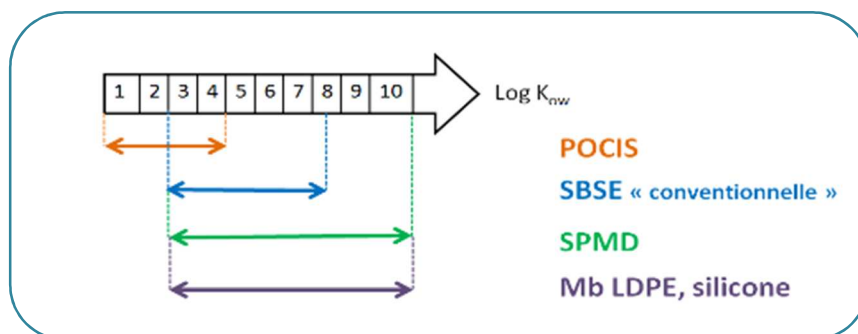


Figure 6 : Sélection des échantillonneurs passifs en fonction du log de Kow d'une substance chimique

Dans le cadre de la présente étude, compte tenu des substances recherchées, les techniques utilisées sont **la SBSE** (Stir Bar Sorptive Extraction) « conventionnelle » et **la membrane silicone**. L'utilisation de la SPMD (Semi-Permeable Membrane Device) est également adaptée aux composés sélectionnés ; néanmoins elle n'est pas employée dans le cadre de cette étude car elle est jugée trop fragile en ce qui concerne sa manipulation et son exposition sur le terrain. A l'inverse, les membranes silicone sont considérées plus robustes et plus simple d'utilisation, elles sont donc mieux adaptées aux points de suivi sélectionnés (tableau 2).

La technique SBSE est appliquée *ex situ* (sur des échantillons d'eau ponctuels), elle permet d'extraire et de concentrer des composés de faible polarité ($\text{Log Kow} > 3$). L'extraction s'effectue par sorption des molécules hydrophobes de l'échantillon d'eau vers un polymère (le polydiméthylsiloxane) qui recouvre un barreau d'agitation aimanté, celui-ci étant plongé dans l'échantillon à analyser. Cette

technique d'extraction permet une mesure ponctuelle de la contamination de l'eau (Gonzalez et *al.*, 2013).

Les membranes silicone permettent de mesurer les concentrations des contaminants dans l'eau qui ont un Log Kow compris entre 3 et 10. Ces échantillonneurs permettent d'obtenir une concentration moyenne en contaminants dans l'eau pour une période d'exposition de 2 à 3 semaines. Ces dispositifs sont de plus en plus utilisés pour la surveillance des milieux aquatiques (Booij et al. 2016).

2. Protocole d'acquisition des données

2.1. Localisation des points d'étude

Suivant les substances recherchées, la première approche consisterait à prendre en compte l'occupation du territoire et les usages, afin de cibler **les pressions humaines** en fonction des activités définies pour chaque bassin versant : agricole, industrielle, urbaine, portuaire,... Néanmoins, en l'absence de typologie de pression définie pour ces différents bassins versants, cette approche ne peut être conduite.

Aussi, les points de suivi sont ciblés par dire d'experts (ROCCH et Laboratoire Environnement et Ressources (LER) de l'Ifremer) permettant ainsi d'identifier les secteurs susceptibles de présenter des niveaux de contamination suffisamment stables et élevés pour être quantifiés. L'accessibilité présumée aux points de suivi par moyen nautique doit également être prise en compte. Pour chaque sous-région marine, les points, matrices et calendrier de suivi sont précisés dans le tableau 2.

Sous-région marine	Points de suivi proposé	Pression (substance)	Matrice eau	Echantillonneur passif	Matrice moule	Calendrier prélèvement
Manche – Mer du Nord	Antifer	Influence indirecte du panache de la Seine Site Portuaire	Eau brute Eau filtrée	SBSE DGT ; DGT Hg Membrane silicone	Moules sauvages Moules encagées	T4 2016
	Rade de Cherbourg	Site portuaire (PCB et dioxines)	Eau brute Eau filtrée	SBSE DGT ; DGT Hg Membrane silicone	Moules encagées	T1 2017
Golfe de Gascogne <i>Points à confirmer</i>	Pointe de Chemoulin / Lorient		Eau brute Eau filtrée	SBSE DGT ; DGT Hg Membrane silicone	Moules sauvages Moules encagées	T1 2018
	Les Palles / La moulière	Agricole / Agricole	Eau brute Eau filtrée	SBSE DGT ; DGT Hg Membrane silicone	Moules sauvages Moules encagées	T1 2018
Méditerranée occidentale <i>Points à confirmer</i>	Etang de Thau / Etang de Bages	Urbain et agricole / Industrielle, agricole	Eau brute Eau filtrée	SBSE DGT ; DGT Hg Membrane silicone	Moules sauvages Moules encagées	T3 2017 <i>(à confirmer- cohérence étude Aquaref déploiement EP)</i>
	Baie du Lazaret	Portuaire, urbaine et industrielle (Cd, Pb, HAP)	Eau brute Eau filtrée	SBSE DGT ; DGT Hg Membrane silicone	Moules sauvages Moules encagées	T3 2017 <i>(à confirmer- cohérence étude Aquaref déploiement EP)</i>

Tableau 2 : Points, matrices et calendrier de suivi par sous-région marine

2.2. Quelles méthodes valides pour les substances étudiées ?

Un bilan des méthodes utilisables pour les substances étudiées est fait tableau 3. Cet état des lieux permet de vérifier si les différentes méthodes d'analyses des échantillons d'eau (par les méthodes classiques ou via les échantillonneurs passifs) sont adaptées aux exigences réglementaires de la DCE (respect de l'atteinte des limites de quantification (LQ)). Les informations sur les EP sont issues de la note de synthèse du groupe Aquaref (Miège et *al.*, 2014). Les éléments pour les analyses d'eau « classiques » sont tirés du devis transmis par Alpa Chimies (annexe 1). Pour les analyses d'eau, la DCE impose que la limite de quantification (LQ) du laboratoire d'analyse soit inférieure à $LQ \leq NQE/3$, le groupe de travail Aquaref a dans certains cas accepté $LQ \leq NQE/2$ en comptant sur une prochaine amélioration des techniques analytiques.

Substance	Méthodes adaptées à la surveillance DCE (Miège <i>et al.</i> , 2014 ; Alpa Chimies, 2016 ; Cèdre, 2016)				Méthodes retenues pour cette étude
	Echantillonnage ponctuel		Echantillonnage intégratif		
	Méthode classique	SBSE	Membrane silicone	DGT	
Aldrine	Oui	Oui	Potentiel		Classique + SBSE + membrane silicone
Isodrine	Oui	Oui	Potentiel		Classique + SBSE + membrane silicone
Dieldrine	Oui	Oui	Possible		Classique + SBSE + membrane silicone
Endrine	Oui	Oui	Possible		Classique + SBSE + membrane silicone
pp' DDT	Oui	Oui	Possible		Classique + SBSE + membrane silicone
op' DDT	Oui	Oui	Possible		Classique + SBSE + membrane silicone
pp' DDE	Oui	Oui	Possible		Classique + SBSE + membrane silicone
pp' DDD	Oui	Oui	Possible		Classique + SBSE + membrane silicone
Somme des hexachlorocyclohexanes	Oui mais LQ= NQE/2	Oui	Oui		Classique + SBSE + membrane silicone
PBDE	Oui	Faisable	Oui		Classique + SBSE + membrane silicone
Anthracène	Oui	Oui	Oui		Classique + SBSE
Naphtalène	Oui	Oui	Oui		Classique + SBSE
Chlorfenvinphos	Oui	Oui	Oui		Classique + SBSE
Chlorpyrifos	Oui	Oui	Oui		Classique + SBSE
Trifluraline	Oui	Faisable	Potentiel		Classique + SBSE
Di(2-ethylhexyl)phtalate	Oui	Oui	Possible		Classique + SBSE
Somme des trichlorobenzènes	Oui	Faisable	Potentiel		Classique + SBSE
Cadmium et ses composés	Oui mais LQ= NQE/2			Oui	Classique + DGT
Plomb et ses composés	Oui			Oui	Classique + DGT
Nickel	Oui			Oui	Classique + DGT
Endosulfan	Non (différent de synthèse Aquaref)	Oui	Oui		SBSE + membrane silicone
Mercure et ses composés	Non	Oui, mais dérivation <i>in situ</i>		Oui	DGT Hg
Terbutryne	Non	Oui	Oui		SBSE
Chloroalcanes, C10-13	Non	Faisable	Potentiel		SBSE
Pentachlorobenzène	Non	Faisable	Possible		SBSE
Quinoxylène	Non	Faisable	Potentiel		SBSE
Aclonifène	Non	Faisable	?		SBSE
Bifénox	Non	Faisable	Potentiel		SBSE
Cybutryne (Irgarol)	Non	Faisable	Oui		SBSE
Cyperméthrine	Non	Faisable	Potentiel		SBSE
Pentachlorophénol	Oui	Oui, mais dérivation <i>in situ</i>	?		Classique
Nonylphénols (4-Nonylphénol ramifié)	Oui	Oui, mais dérivation <i>in situ</i>	Oui		Classique
Composés du tributylétain (tributylétain-cation)	Non	Oui, mais dérivation <i>in situ</i>	Potentiel		Aucune méthode identifiée pour l'acquisition de données de concentration dans l'eau car LQ non adaptée
Octylphénols (4-(1,1',3,3'-tétraméthylbutyl)-phénol)	Oui	Oui, mais dérivation <i>in situ</i>	Oui		Classique

Les informations pour les EP sont tirées de la note de synthèse Aquaref (Miège *et al.*, 2014), des informations fournies par Céline Tixier (LBCO) et du devis du Cèdre (annexe 1) : « potentiel » : données dans la littérature qui démontre l'applicabilité mais aucune donnée française et aucune information sur la LQ ; « possible » : application à large échelle, pas de données en France, pas d'information sur la LQ ; « ? » : manque d'information.

Tableau 3 : Les méthodes adaptées à la surveillance DCE en terme de LQ (Miège *et al.*, 2014), complétées par les informations transmises par les laboratoires Alpa Chimie et Cèdre (Annexe 1) et les méthodes retenues pour la présente étude pour chaque substance étudiée

D'après le tableau 3, la surveillance par échantillonnage ponctuel d'eau « classique » (hors SBSE) apparaît adaptée pour 22 substances, dont 2 avec $LQ = NQE/2$ (hexachlorocyclohexane et cadmium). Le suivi « classique » dans l'eau est inadapté pour 12 substances. Pour l'endosulfan, la LQ affichée par Alpa Chimies ne permet pas d'atteindre le niveau requis ($NQE = LQ/3$), alors que ce niveau était acquis par la médiane affichée par Aquaref.

La mesure de la concentration des substances chimiques par la technique SBSE est adaptée pour 21 substances, dont 5 (mercure, nonylphénols, octylphénols, TBT et pentachlorophénol) pour lesquelles une dérivation *in situ* est nécessaire afin d'abaisser les limites de quantification. Pour 10 substances, des développements analytiques (sans dérivation *in situ*) sont possibles afin d'extraire et d'analyser ces substances (indiquée en tant que « faisable » dans le tableau). Pour 3 substances (cadmium, plomb et nickel), la technique SBSE est inadaptée.

La mesure de la concentration en contaminants par les échantillonneurs passifs intégratifs (EIP) : DGT pour les métaux et membranes silicone pour les composés organiques peut être effectuée pour 15 substances.

A partir de ces informations, les méthodes retenues pour cette étude sont identifiées pour chaque substance (tableau 3) :

- **méthodes « classique » et 2 EP (SBSE et membrane silicone)**, seront appliquées pour 10 substances qui correspondent à **4 substances prioritaires** (ou groupe de substances) **DCE** (les pesticides cyclodiènes, les DDT totaux, la somme des hexachlorocyclohexanes et les PBDE).
- **méthodes « classique » et EP** seront appliquées pour **10 substances prioritaires DCE**, 7 utilisant la SBSE (anthracène, naphthalène, chlorfenvinphos, chlorpyrifos, trifluraline, DEHP et somme des trichlorobenzènes), 3 utilisant le DGT (cadmium, plomb et nickel) et 1 utilisant les membranes silicone (endosulfan).
- **méthodes EP** sont appliquées pour **9 substances prioritaires DCE**, 8 substances utilisant la SBSE (terbutryne, chloroalcanes C10-13, pentachlorobenzène, quinoxifène, acclonifène, bifénox, cybutryne, cyperméthrine) et le mercure qui nécessite l'utilisation de DGT spécifique Hg.
- **Méthode « classique »** est appliquée pour le pentachlorophénol, les nonylphénols et les octylphénols.

La concentration pour certains contaminants peut être déterminée *via* la méthode SBSE ou par les membranes silicone (substances surlignées en bleu dans le tableau 3). Néanmoins, pour la SBSE cela demande l'utilisation de dérivation *in situ* afin d'abaisser les limites de quantification pour ces substances. Pour les membranes silicone, l'analyse de ces contaminants ne pourra pas être réalisée par le laboratoire LBCO, aussi des laboratoires experts sont recherchés de façon complémentaire si possible pour acquérir des données sur ces substances. Dans le cadre de cette étude, ces substances ne seront donc pas analysées *via* ces méthodes.

Pour les composés du TBT, aucune méthode analytique n'est retenue pour l'acquisition de données de concentration dans la matrice eau dans le cadre de cette étude.

2.3. Déroulement de l'étude

Comme indiqué dans le § 1.1., le BAF « terrain » doit être déterminé une fois l'état d'équilibre atteint. Le protocole varie selon que l'on considère des moules sauvages ou des moules encagées.

Acquisition de données eau et moules sauvages

L'utilisation de moules sauvages (adultes, de taille 45-55 mm) présentes depuis 6 mois minimum sur site permet de considérer qu'elles sont à l'état d'équilibre (Belin *et al.*, 2015 ; Claisse, 2012).

Comme précisé sur la figure 7, les échantillonneurs passifs intégratifs (la membrane silicone et les DGT) seront immergés en triplicat sur les points définis à J0 et sont déployés pour une durée de 3 semaines. Au bout de 3 semaines, les prélèvements seront réalisés selon l'ordre suivant :

- ❶ Prélèvements d'eau pour les analyses « classique » (sur eau filtrée et eau brute), pour les analyses par SBSE (sur eau filtrée et eau brute) et pour les mesures physico-chimiques (cf. § 2.5.),
- ❷ Prélèvements d'échantillonneurs passifs (DGT et membrane silicone),
- ❸ Prélèvement de moules sauvages.

Cet ordre permet de préserver au mieux la stabilité des niveaux de contaminants dans l'eau et d'éviter toutes perturbations du milieu liées à la manipulation des moules sauvages ou encagées. Les deux prélèvements doivent être concomitants afin d'obtenir une valeur de BAF « terrain » aussi fiable que possible.

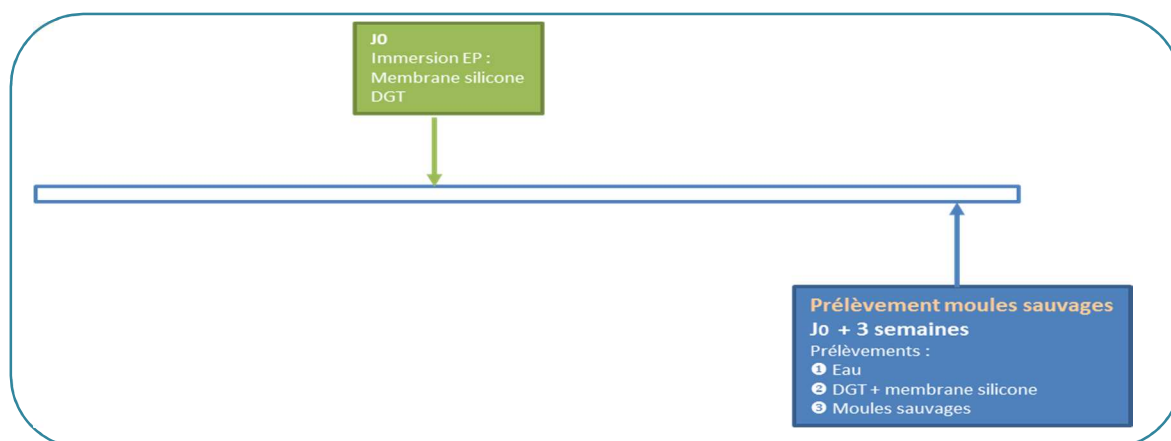


Figure 7 : Chronologie étude eau - moules sauvages

Acquisition de données eau et moules encagées

Pour les moules encagées, comme indiqué § 1.3 une immersion de 3 mois minimum est nécessaire. Suite à une préparation appropriée, les moules (adultes, de taille 45-55 mm) issues du site de référence (modalités précisées en annexe 2) sont placées dans des poches ostréicoles. 4 kg de moules sont placées dans 3 poches ostréicoles distinctes, appelées « poches filles », de maille de 18 mm et de dimension 0,5 m x 0,35 m. Les poches sont placées conjointement à l'horizontale et reliées les unes

aux autres à l'aide de tube en PVC, afin de former « la poche mère » qui contiendra au total 12 kg de moules. L'ensemble est rigidifié par deux tubes de PVC de diamètre 40 mm qui sont fendus dans leur longueur et enfilés sur la partie supérieure et inférieure des poches (figure 8). Au point souhaité, la poche mère est placée à 6 m en dessous de la surface de l'eau, à l'aide d'une ligne fixée à une structure d'ancrage.

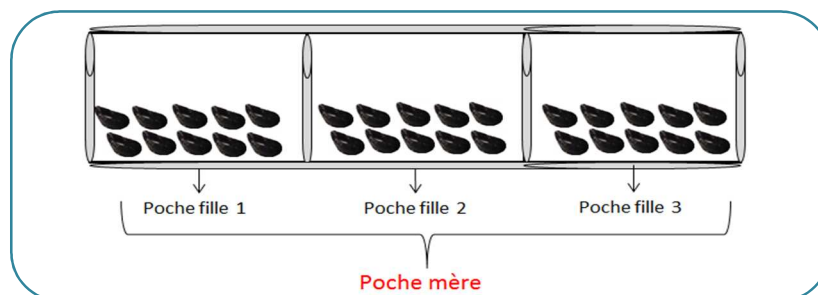


Figure 8 : Schéma d'une cage utilisée pour cet essai

Comme précisé sur la figure 9, les moules encagées sont immergées aux points définis à J0 en veillant à prendre en compte les échantillons nécessaires à la détermination de la concentration initiale des moules. L'immersion des EIP (DGT et membrane silicone) en triplicat, se fait à J0 + 75 jours et ils seront prélevés à J0 + 96 jours. Trois prélèvements hebdomadaires consécutifs sont réalisés simultanément sur l'eau (méthode « classique » et SBSE) et les moules encagées. Comme pour les moules sauvages, les prélèvements seront réalisés selon l'ordre suivant :

- ❶ Prélèvements d'eau pour les analyses « classique » (sur eau filtrée et eau brute), pour les analyses par SBSE (sur eau filtrée et eau brute) et pour les mesures physico-chimiques (cf. § 2.5.),
- ❷ Prélèvements d'échantillonneurs passifs (DGT et membrane silicone),
- ❸ Prélèvement de moules encagées.

Cet ordre permet de préserver au mieux la stabilité des niveaux de contaminants dans l'eau et d'éviter toutes perturbations du milieu liées à la manipulation des moules sauvages ou encagées.

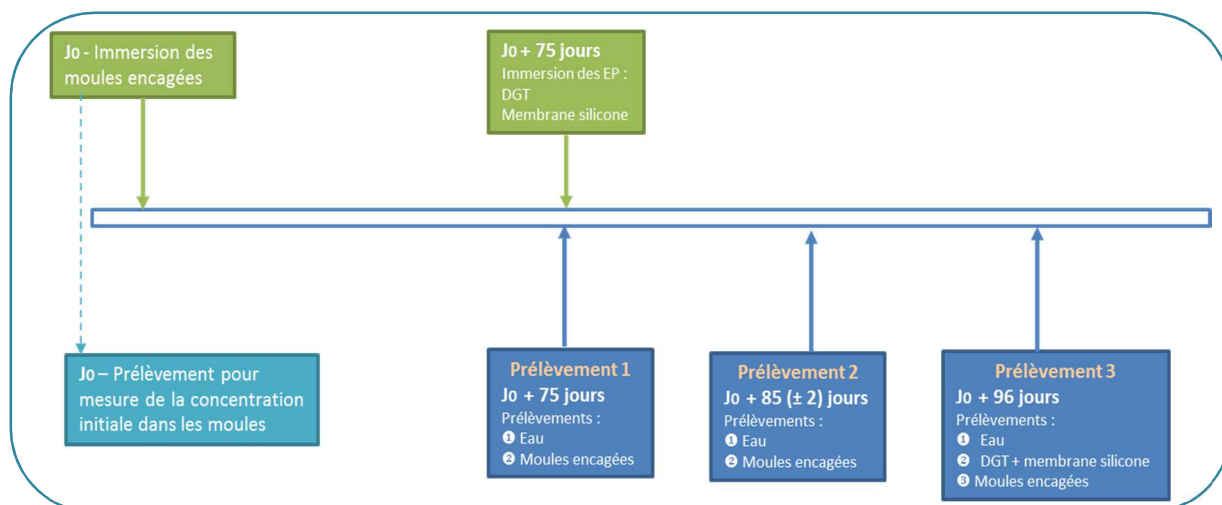


Figure 9 : Chronologie étude eau - moules encagées

Cas des points suivis à la fois pour les moules sauvages et les moules encagées

Pour certains points de suivi, la mesure des concentrations en contaminants dans les moules est réalisée à la fois sur les moules encagées et les moules sauvages. De ce fait, **le prélèvement des moules sauvages sera réalisé à J0 + 96 jours en même temps que le prélèvement des moules encagées.**

Acquisition de données échantillonneurs passifs

La préparation, la mise en place et la récupération des échantillonneurs passifs est supervisée par Jean-Louis Gonzalez (LBCM) pour les DGT, DGT Hg et SBSE, et Céline Tixier (LBCO) pour les membranes silicone.

2.4. Prélèvements

Les modalités de préparation et de prélèvement d'eau et de moules sont décrites dans le guide d'échantillonnage en milieu marin (Amouroux et Claisse, 2015) et ne sont pas reprises dans ce présent document mais doivent être prises en compte dans le cadre de l'échantillonnage.

a. Prélèvements d'eau

Afin de déterminer les concentrations en contaminants, des prélèvements d'eau sont réalisés. Quelle que soit la substance étudiée, les analyses sont réalisées systématiquement sur l'eau filtrée ($< 0,45 \mu\text{m}$ pour les composés métalliques et organiques) et pour certains points de suivi sur l'eau brute. Dans l'idéal, le prélèvement d'eau doit être réalisé à la même profondeur que les moules. Si cela n'est pas réalisable, du fait du trop faible niveau de concentration des substances à cette profondeur, les prélèvements seront réalisés en surface à une profondeur de 50 cm (au minimum 30 cm).

Les flaconnages et les volumes d'eau diffèrent suivant les substances recherchées. Ces éléments complétés des méthodes utilisées et des seuils de quantification sont précisés annexe 1 par le laboratoire chargé des analyses : ALPA Chimies (offre n°2016C040129/5). Au total, en terme de flaconnage, chaque échantillonnage en un point de suivi représente : 5 flacons 1 L verre et 2 flacons 40 mL verre brun pour les analyses sur eau brute ; et 5 flacons 1L verre, 2 flacons 40 mL verre brun et 1 flacon carré 250 mL pour les analyses sur eau filtrée (la filtration sera réalisé par les laboratoires analystes).

Certains flacons peuvent contenir des stabilisants (thiosulfate de sodium), lors du prélèvement ils ne doivent donc pas être rincés préalablement avec l'eau de mer échantillonnée (suivre les indications fournies par le laboratoire analyste).

Une fois les prélèvements d'eau réalisés, les échantillons sont transmis au laboratoire analyste (ALPA chimie) sous 24h et maintenus à une température de $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

b. Prélèvement des échantillonneurs passifs

Pour les échantillonneurs passifs intégratifs : **DGT, DGT Hg et membranes silicone**, leurs modalités de mise en place et de récupération sont spécifiées par Jean-Louis Gonzalez (LBCM) et Céline Tixier (LBCO). Après récupération par le LER (ou par LBCM en fonction de la façade étudiée), les DGT et DGT Hg sont envoyés au laboratoire LBCM et les membranes silicone sont transmises au laboratoire LBCO dans les meilleurs délais et en veillant à respecter les consignes de stockage et de transport prévues.

Pour la **SBSE**, deux prélèvements d'eau de 500 mL chacun sont réalisés (un pour l'analyse de la fraction brute et un pour la fraction dissoute). La filtration à $0,45\ \mu\text{m}$ avec des filtres de verre pyrolysés sera réalisée par le Cèdre. Les flaconnages utilisés sont des bouteilles en verre. Ces prélèvements d'eau sont par la suite transmis **congelés** au laboratoire du Cèdre dans les meilleurs délais et en veillant à respecter les consignes de transport (vois devis en annexe 1).

c. Prélèvement de moules sauvages

A chaque point de suivi, **un lot minimum de 320 moules** sera prélevé, ce qui permet de disposer d'une quantité de chair fraîche suffisamment importante (60 à 100g par pilulier) pour réaliser l'ensemble des analyses (contaminants et taux de lipides). Etant donné que les prélèvements d'eau et de mollusques sont concomitants, les moules doivent être immergées au moment du prélèvement.

Le prélèvement est réalisé par le LER (ou LBCM suivant le point considéré), ainsi que la préparation des échantillons. Les moules sont dépurées, décoquillées et réparties dans six piluliers contenant au minimum 50 moules chacun (total 300 moules) afin de réaliser l'analyse des contaminants. En complément, 15-20 moules dépurées sont utilisées pour le suivi biométrique qui est réalisé au LER. Les piluliers d'échantillons de chair sont expédiés en caisse isotherme via transport « Express » (au maximum 24h) à Alpa Chimies (3 piluliers) et au LBCO (3 piluliers) dans les meilleurs délais et en veillant à respecter les consignes de stockage et de transport prévues.

d. Prélèvement de moules engagées

Préalablement à l'immersion des poches ($J_0 + 75$ jours), un échantillon de 300 moules (100 individus dans chaque poche fille) est constitué afin de connaître la concentration initiale des substances recherchées. Cette concentration initiale sera valable pour l'ensemble des points de la façade disposant de suivi moules engagées et pour la période considérée. Ainsi, six piluliers de 50 moules environ sont constitués et envoyés pour analyses aux laboratoires Alpa Chimies et LBCO.

A chaque point de suivi, les moules sont dégrappées des poches. Après homogénéisation du lot de moules vivantes, un prélèvement de moules est fait dans chacune des trois poches filles. En fonction des prélèvements, le nombre de moules dégrappées varie :

- **165 moules minimum par poche mère** (55 moules prélevées dans chacune des 3 poches filles) à **J0 + 75 jours (prélèvement 1) et J0 + 85 jours (prélèvement 2)** ;
- **330 moules minimum par poche mère** (110 moules prélevées dans chacune des 3 poches fille) à **J0 + 96 jours (prélèvement 3)**.

Les moules sélectionnées sont rincées extérieurement à l'eau de mer sur les lieux de prélèvement. La mortalité est directement mesurée, cette estimation intègre la mortalité due aux opérations de calibrage (20%). C'est un indicateur de bonnes ou de mauvaises conditions du milieu pour la survie des moules (Sargian et Andral, 2013). Par la suite, elles sont placées dans un sachet en polyéthylène, identifié et complété d'une fiche de prélèvement terrain. L'échantillon par poche mère ainsi constitué, sera utilisé d'une part pour le suivi biométrique (15-20 individus) qui sera réalisé au LER et d'autre part pour l'analyses des substances (150 moules pour les 2 premiers prélèvements et 300 moules pour le dernier).

Une fois le prélèvement réalisé par le LER, les moules sont dépurées, décoquillées et réparties dans les piluliers :

- **3 piluliers de 50 moules au minimum sont constitués pour les 2 premiers prélèvements (J0+75 jours et J0 + 85 jours)**. Ces piluliers sont envoyés à Alpa Chimies qui effectue la totalité des analyses ;
- **6 piluliers de 50 moules minimum sont préparés pour le prélèvement 3 (J0 + 96 jours)**. 3 piluliers sont expédiés à Alpa Chimies et 3 piluliers sont transmis au LBCO.

2.5. Paramètres complémentaires de suivi

De façon complémentaire, afin de permettre d'exploiter au mieux les résultats, certaines mesures sont à prévoir lors des déplacements **sur les points d'études** :

- Suivi physico-chimique : la température, la salinité et l'oxygène dissous sont mesurées à l'aide d'une sonde multi-paramètres. Pour les DGT, la température de l'eau doit être connue au cours de l'immersion car les coefficients de diffusion varient sensiblement avec la température. Ainsi, la valeur mesurée à 25°C qui est fournie par DGT Research Ltd. doit être ajustée. Au minimum, elle doit être mesurée lors de la mise en place et lors de la récupération des échantillonneurs passifs, notamment dans les milieux où l'on sait que les variations de température sont relativement faibles (Gonzalez et *al.*, 2015).
- Pour les moules encagées, l'apport alimentaire doit être déterminé en mesurant la quantité de chlorophylle *a* et de phéopigments dans l'eau. En complément, les quantités de carbone organique dissous et particulaire et de matières en suspension présent dans l'eau doivent également être connus. Ces données seront obtenues par le biais du réseau national de

surveillance du phytoplancton et des phycotoxines (REPHY) qui réalise chaque semaine (lors des périodes à risques) ou tous les 15 jours (hors des périodes à risque) des prélèvements d'eau à des points de suivi proches ou identiques de ceux sélectionnés dans le cadre de cette étude.

A ces mesures *in situ*, s'ajoutent également pour les moules sauvages et encagées, un suivi biométrique qui permet de connaître l'état physiologique et la croissance des moules (Casas, 2005). Ce suivi prévoit la mesure du poids humide et du poids sec de chair des organismes, du poids sec de la coquille, ainsi que la longueur, la largeur et la hauteur de la coquille (mesurées à l'aide d'un pied à coulisse).

2.6. Analyses

Suivant les supports concernés, les échantillons sont transmis pour analyses aux laboratoires. La figure 10 permet de visualiser sur la base des prélèvements réalisés, le circuit de transmission des différents échantillons ainsi que les différents intervenants.

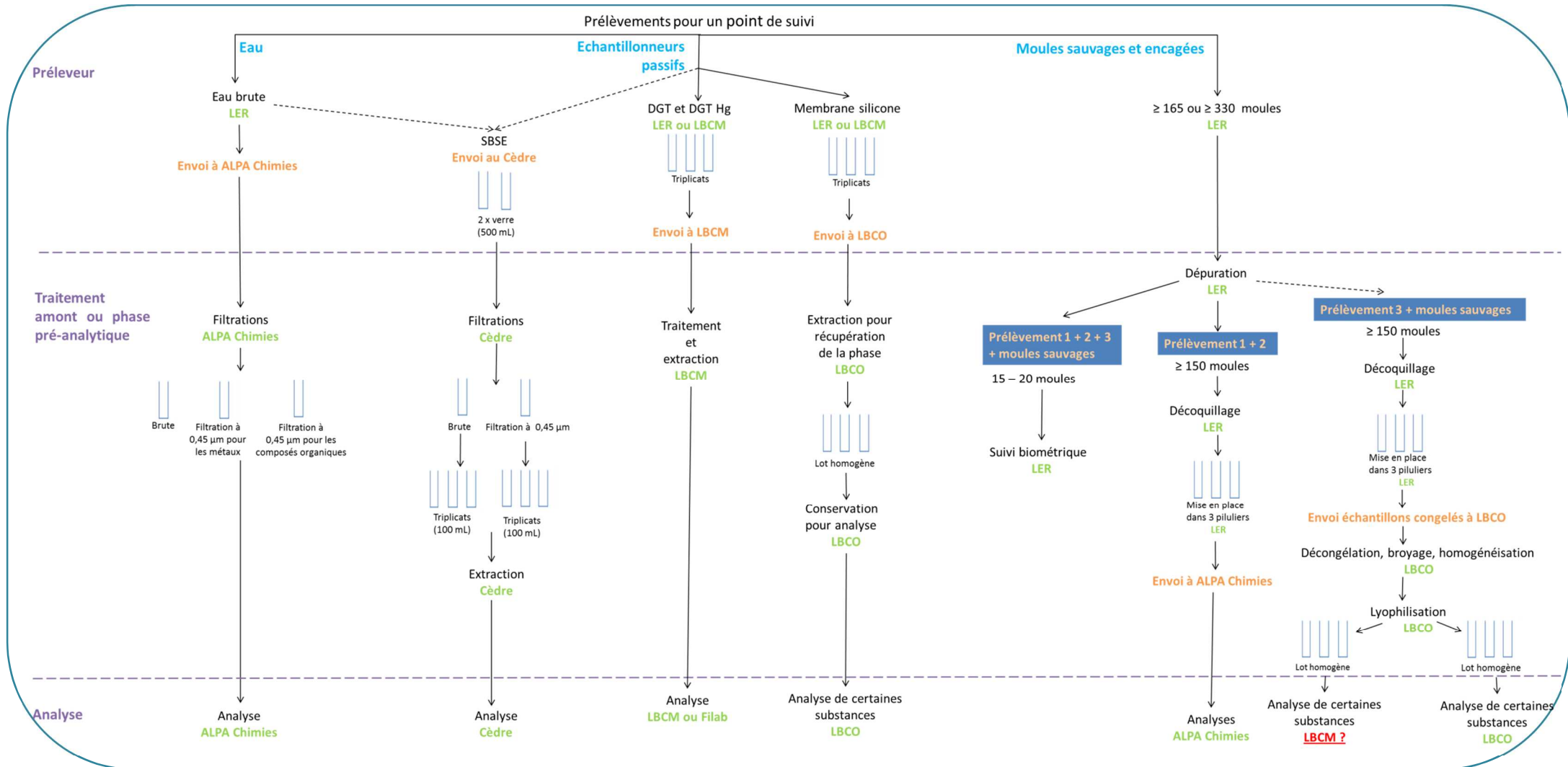


Figure 10 : Circuit de transmission des échantillons et les différents intervenants en fonction des matrices analysées

Analyses d'eau

Les analyses sur l'eau permettent de mesurer les niveaux de concentrations des 22 substances identifiées dans le tableau 4. Les méthodes utilisées ainsi que les seuils de quantification associés sont précisés par le laboratoire chargé des analyses : Alpa Chimies (annexe 1).

Analyses des échantillonneurs passifs

Pour les **DGT et DGT Hg**, un traitement et une extraction sont réalisés au LBCM dans le but de récupérer la phase à analyser. Les mesures de la concentration en contaminants identifiés dans le tableau 4 sont effectuées par le LBCM ou par un laboratoire sous-traitant : Filab après transmission de la phase à analyser.

Pour les **membranes silicone**, après récupération de la phase par LBCO, la recherche des substances chimique identifiées dans le tableau 4 est faite par le LBCO. Pour les autres contaminants, en lien avec Aquaref, la possibilité de recourir éventuellement à d'autres laboratoires experts est étudiée.

Pour la **SBSE**, les concentrations des substances chimiques étudiées (tableau 4) sont mesurées dans la fraction brute et dissoute (filtration à 0,45 µm) de l'eau. La filtration à 0,45 µm est effectuée par le Cèdre sur un des deux flacons prélevés. Par la suite, l'extraction par sorption des molécules hydrophobes présentes dans l'eau sur un barreau d'agitation aimanté recouvert d'un polymère (le polydiméthylsiloxane) est réalisée pour les deux flacons (eau brute et dissoute). Après l'extraction, l'analyse des contaminants est réalisée au Cèdre.

Analyses des moules

Les échantillons prélevés pour mesurer la concentration initiale des moules engagées sont transmis par le LER au laboratoire Alpa Chimies (3 piluliers) et au laboratoire LBCO (3 piluliers) pour analyses. Le tableau 4 précise les substances recherchées par chaque laboratoire dans les moules.

Les échantillons prélevés à J0 + 75 jours (prélèvement 1) et J0 + 85 jours (prélèvement 2) sont transmis à Alpa Chimies. Les échantillons prélevés à J0 + 96 jours (prélèvement 3) sont transmis pour moitié à Alpa Chimies (3 échantillons moules engagées et/ou 3 échantillons moules sauvages) et pour moitié au LBCO (3 échantillons moules engagées et/ou 3 échantillons moules sauvages).

N° CAS	Substance	Laboratoire Alpa Chimies			Laboratoire Cèdre		Laboratoire LBCO		Laboratoire Filab ou LBCM	Laboratoire LBCM
		Matrice "eau brute"	Matrice "eau filtrée à 0,45 µm"	Matrice "moules"	Matrice "eau brute"	Matrice "eau filtrée à 0,45 µm"	Matrice "membrane silicone"	Matrice "moules"	Matrice "DGT et DGT Hg"	Matrice "moules"
120-12-7	Anthracène	X	X	X	X	X				
32534-81-9	Diphényléthers bromés	X	X		X	X	X	X		
7440-43-9	Cadmium et ses composés		X	X					X	X
85535-84-8	Chloroalcanes, C10-13			X	X	X				
470-90-6	Chlorfenvinphos	X	X	X	X	X				
2921-88-2	Chlorpyrifos	X	X	X	X	X				
X	Pesticides cyclodiennes	X	X	X	X	X	X	X		
X	DDT total	X	X	X	X	X	X	X		
117-81-7	Di(2-ethylhexyle)phthalate	X	X	X	X	X				
115-29-7	Endosulfan			X	X	X	X	X		
608-73-1	Hexachlorocyclohexane	X	X	X	X	X	X	X		
7439-92-1	Plomb et ses composés		X	X					X	X
7439-97-6	Mercure et ses composés		X	X					X	X
91-20-3	Naphtalène	X	X	X	X	X				
7440-02-0	Nickel		X	X					X	X
84852-15-3	Nonylphénols (4-nonylphénol)	X	X	X						
140-66-9	Octylphénols (4-(1,1',3,3'-tétraméthylbutyl)-phénol)	X	X	X						
608-93-5	Pentachlorobenzène	X	X	X	X	X				
87-86-5	Pentachlorophénol	X	X	X						
36643-28-4	Composés du tributylétain (tributylétain-cation)									
12002-48-1	Trichlorobenzène	X	X	X	X	X				
1582-09-8	Trifluraline	X	X	X	X	X				
124495-18-7	Quinoxifène	X	X	X	X	X				
74070-46-5	Aclonifène	X	X	X	X	X				
42576-02-3	Bifénox	X	X	X	X	X				
28159-98-0	Cybutryne (Irgarol)	X	X	X	X	X				
52315-07-8	Cyperméthrine	X	X	X	X	X				
886-50-0	Terbutryne	X	X	X						

Tableau 4 : Identification des laboratoires analystes en fonction des matrices et substances étudiées

A Alpa Chimies, pour mesurer les niveaux de concentration des contaminants dans les moules, les échantillons sont analysés avec la méthode développée en 2016 par ce laboratoire (chromatographie gaz-spectrométrie de masse haute résolution), à la demande de la Cellule ARC, en vue d'abaisser au maximum les limites de quantification. Pour les chloroalcanes C10-13, les nonylphénols et le TBT et ses composés, cette méthode analytique n'est pas adaptée et ne peut être employée (problème de déviation notamment). La mesure des concentrations de ces contaminants dans les moules peut se faire *via* les méthodes analytiques classiques, néanmoins cette méthode présente une LQ plus élevée que la méthode haute résolution.

Dans le cadre de cette étude, étant donné qu'aucune acquisition de données sur la matrice eau n'est possible pour le TBT et ses composés (cf. tableau 3), les niveaux de concentration de cette substance dans les moules ne seront donc pas mesurés.

Pour les nonylphénols et les octylphénols, une acquisition de données sur la matrice eau est possible *via* la méthode analytique classique et/ou la SBSE, la mesure des concentrations de ces substances dans les moules se feront donc par la méthode analytique classique : la chromatographie gaz-spectrométrie de masse.

Au LBCO, après réception des 3 piluliers congelés (par point de suivi), une décongélation, un broyage, une homogénéisation de la chair des organismes est effectuée **au sein de chaque pilulier**. Après lyophilisation, **chaque pilulier est redistribué en deux lots homogènes** : le premier lot (3 piluliers) est analysé au LBCO et permet de déterminer les niveaux de concentration des substances identifiées dans le tableau 4, le deuxième lot (3 piluliers) est transmis au LBCM (tableau 4).

En complément des analyses de contaminants, pour chaque échantillon les teneurs en lipides (selon la méthode de Bligh et Dyer (1959)) et en matière sèche des moules doivent être déterminées.

Il est demandé à chaque laboratoire intervenant de préciser si des blancs sont réalisés et si des étalons de rendements sont utilisés.

Un bilan des échantillons transmis aux différents intervenants est précisé tableau 5 ainsi que l'estimation du coût en fonction du calendrier prévisionnel.

Année	Façade (point de suivi)	Matrice	Intervenants	Nombre d'échantillons à analyser	Total échantillons	Estimation du coût		
T4 2016	Manche mer du nord (Antifer)	Eau : classique : eau brute et filtrée	Alpa Chimies	6 (3 échantillons eau brute et 3 échantillons eau filtrée)	6	3735,00		
		Eau : SBSE : eau brute et filtrée	Cèdre	6 SBSE en triplicats (3 échantillons eau brute et eau filtrée) soit 18 SBSE	18	6300,00		
		DGT	LBCM ou Filab	1 DGT en triplicat soit 3 DGT	3	300,00		
		DGT Hg	LBCM ou Filab	1 DGT Hg en triplicat soit 3 DGT Hg	3	300,00		
		Membrane silicone	LBCO	1 Mb silicone en triplicat soit 3 Mb silicone	3			
		Moules encagées	LBCO	1 pour la C° initiale (J0) (en triplicats soit 3 échantillons) + 1 (en triplicat soit 3 échantillons à J0+96)	6	2500,00		
		Moules sauvages	LBCO	1 (en triplicat soit 3 échantillons à J0+96)	3			
		Moules encagées	Alpa chimies	1 pour la C° initiale (J0) (3 en triplicats) + 3 (en triplicats (J0+75, + 85 et + 96j)) soit 9 échantillons	12	9788,40		
		Moules sauvages	Alpa chimies	1 (en triplicat, soit 3 échantillons à J0+96)	3	2447,10		
						Coût total	25370,50	
T1 2017	Manche mer du nord (Rade de Cherbourg)	Eau : classique : eau brute et filtrée	Alpa Chimies	6 (3 échantillons eau brute et 3 échantillons eau filtrée)	6	3735,00		
		Eau : SBSE : eau brute et filtrée	Cèdre	6 SBSE en triplicats (3 échantillons eau brute et eau filtrée) soit 18 SBSE	18	3300,00		
		DGT	LBCM ou Filab	1 DGT en triplicat soit 3 DGT	3	300,00		
		DGT Hg	LBCM ou Filab	1 DGT Hg en triplicat soit 3 DGT Hg	3	300,00		
		Membrane silicone	LBCO	1 Mb silicone en triplicat soit 3 Mb silicone	3			
		Moules encagées	LBCO	1 pour la C° initiale (J0) (en triplicats soit 3 échantillons) + 1 (en triplicat soit 3 échantillons à J0+96)	6	2500,00		
		Moules encagées	Alpa chimies	1 pour la C° initiale (J0) (en triplicats soit 3 échantillons) + 3 (en triplicats (J0+75, + 85 et + 96j)) soit 9 échantillons	12	9788,40		
						Coût total	19923,40	
		T3 2017 (A voir avec l'étude AQUAREF)	Méditerranée occidentale (baie du Lazaret)	Eau : classique : eau brute et filtrée	Alpa Chimies	6 (3 échantillons eau brute et 3 échantillons eau filtrée)	6	3735,00
				Eau : SBSE : eau brute et filtrée	Cèdre	6 SBSE en triplicats (3 échantillons eau brute et eau filtrée) soit 18 SBSE	18	3300,00
DGT	LBCM ou Filab			1 DGT en triplicat soit 3 DGT	3	300,00		
DGT Hg	LBCM ou Filab			1 DGT Hg en triplicat soit 3 DGT Hg	3	300,00		
Membrane silicone	LBCO			1 Mb silicone en triplicat soit 3 Mb silicone	3			
Moules encagées	LBCO			1 pour la C° initiale (J0) (en triplicats soit 3 échantillons) + 1 (en triplicat soit 3 échantillons à J0 + 96 jours)	6	2500,00		
Moules sauvages	LBCO			1 (en triplicat soit 3 échantillons à J0 + 96 jours)	3			
Moules encagées	Alpa chimies			1 pour la C° initiale (J0) (3 en triplicats) + 3 (en triplicats (J0 + 75, + 85 et + 96j)) soit 9 échantillons	12	9788,40		
Moules sauvages	Alpa chimies			1 (en triplicat, soit 3 échantillons à J0+96)	3	2447,10		
						Coût total	22370,50	
T3 2017 (A voir avec l'étude AQUAREF)	Méditerranée occidentale (Etang de Thou ou Bages)	Eau : classique : eau brute et filtrée	Alpa Chimies	6 (3 échantillons eau brute et 3 échantillons eau filtrée)	6	3735,00		
		Eau : SBSE : eau brute et filtrée	Cèdre	6 SBSE en triplicats (3 échantillons eau brute et eau filtrée) soit 18 SBSE	18	3300,00		
		DGT	LBCM ou Filab	1 DGT en triplicat soit 3 DGT	3	300,00		
		DGT Hg	LBCM ou Filab	1 DGT Hg en triplicat soit 3 DGT Hg	3	300,00		
		Membrane silicone	LBCO	1 Mb silicone en triplicat soit 3 Mb silicone	3			
		Moules encagées	LBCO	1 (en triplicat soit 3 échantillons à J0 + 96 jours)	3	2500,00		
		Moules sauvages	LBCO	1 (en triplicat soit 3 échantillons à J0 + 96 jours)	3			
		Moules encagées	Alpa chimies	3 (en triplicats (J0 + 75, + 85 et + 96j)) soit 9 échantillons	9	7341,30		
		Moules sauvages	Alpa chimies	1 (en triplicat, soit 3 échantillons à J0+96)	3	2447,10		
						Coût total	19923,40	

Année	Façade (point de suivi)	Matrice	Intervenants	Nombre d'échantillons à analyser	Total échantillons	Estimation du coût
T1 2018	Golfe de Gascogne (Les Palles / La moulière)	Eau : classique : eau brute et filtrée	Alpa Chimies	6 (3 échantillons eau brute et 3 échantillons eau filtrée)	6	3735,00
		Eau : SBSE : eau brute et filtrée	Cèdre	6 SBSE en triplicats (3 échantillons eau brute et eau filtrée) soit 18 SBSE	18	3300,00
		DGT	LBCM ou Filab	1 DGT en triplicat soit 3 DGT	3	300,00
		DGT Hg	LBCM ou Filab	1 DGT Hg en triplicat soit 3 DGT Hg	3	300,00
		Membrane silicone	LBCO	1 Mb silicone en triplicat soit 3 Mb silicone	3	
		Moules encagées	LBCO	1 pour la C° initiale (J0) (en triplicats soit 3 échantillons) + 1 (en triplicat soit 3 échantillons à J0+96)	6	2500,00
		Moules sauvages	LBCO	1 (en triplicat soit 3 échantillons à J0+96)	3	
		Moules encagées	Alpa chimies	1 pour la C° initiale (J0) (3 en triplicats) + 3 (en triplicats (J0+75, + 85 et + 96j)) soit 9 échantillons	12	9788,40
		Moules sauvages	Alpa chimies	1 (en triplicat, soit 3 échantillons à J0+96)	3	2447,10
				Coût total	22370,50	
T1 2018	Golfe de Gascogne (Pointe de chemoulin / Lorient)	Eau : classique : eau brute et filtrée	Alpa Chimies	6 (3 échantillons eau brute et 3 échantillons eau filtrée)	6	3735,00
		Eau : SBSE : eau brute et filtrée	Cèdre	6 SBSE en triplicats (3 échantillons eau brute et eau filtrée) soit 18 SBSE	18	3300,00
		DGT	LBCM ou Filab	1 DGT en triplicat soit 3 DGT	3	300,00
		DGT Hg	LBCM ou Filab	1 DGT Hg en triplicat soit 3 DGT Hg	3	300,00
		Membrane silicone	LBCO	1 Mb silicone en triplicat soit 3 Mb silicone	3	
		Moules encagées	LBCO	1 (en triplicat soit 3 échantillons à J0+96)	3	2500,00
		Moules sauvages	LBCO	1 (en triplicat soit 3 échantillons à J0+96)	3	
		Moules encagées	Alpa chimies	1 pour la C° initiale (J0) (3 en triplicats) + 3 (en triplicats (J0+75, + 85 et + 96j)) soit 9 échantillons	12	9788,40
		Moules sauvages	Alpa chimies	1 (en triplicat, soit 3 échantillons à J0+96)	3	2447,10
				Coût total	22370,50	

La mesure de la concentration initiale (C° initiale) des moules encagées est effectuée sur un seul point de suivi et est valable pour l'ensemble des essais qui sont pratiqués au cours de la même période de l'année et sur la même façade.

Tableau 5 : Calendrier prévisionnel de l'étude avec bilan des échantillons transmis aux différentes intervenants et estimation du coût correspondant

3. Traitement et interprétation des résultats

Les résultats des analyses seront transmis à l'ARC pour bancarisation dans Quadrigé² et interprétation. Les résultats des échantillonneurs passifs seront exprimés en $\mu\text{g.g}^{-1}$ et en $\mu\text{g.L}^{-1}$ avec indication des équations utilisées pour passer de la matrice « échantillonneur passif » à la matrice « eau ». Une attention particulière sera donnée à l'interprétation des données des échantillonneurs passifs en lien avec Jean-Louis Gonzalez et Céline Tixier, afin d'explicitier notamment les incertitudes liées à ces données.

Pour les moules sauvages, le rapport $C_{\text{mollusques}}/C_{\text{eau}}$ sera considéré comme étant à l'équilibre et correspondra au BAF de la substance.

Pour les moules encagées, l'état d'équilibre est considéré atteint lorsque les valeurs de $C_{\text{mollusques}}/C_{\text{eau}}$ obtenues pour trois échantillonnages consécutifs ne présentent pas de différences significatives ($\alpha = 0,05$). Le BAF « terrain » retenu pour la substance chimique étudiée correspondra à la moyenne géométrique des trois valeurs ($C_{\text{mollusques}}/C_{\text{eau}}$) mesurées à l'état d'équilibre, à l'instar de ce qui se fait expérimentalement pour le calcul de BCF (ASTM, 2013a).

Comme précédemment indiqué, la normalisation des résultats sera faite. Pour les moules sauvages et encagées, l'US EPA (2003) recommande pour les composés organiques de normaliser les résultats de BAF sur la base du taux de lipides présent dans les organismes. La variation du taux de lipides (influencée par les capacités alimentaires des organismes) peut induire, en effet, une variation de la valeur du BAF pour une même substance chimique. Cette variation va être d'autant plus importante lorsque les organismes sont présents pendant un temps relativement long sur le site d'étude et que les substances étudiées sont faiblement éliminées au cours du temps. La concentration en contaminant normalisée par rapport à la teneur en lipides (C_i) est déterminée en calculant le ratio entre la concentration totale de la substance dans les tissus des moules (C_t) et la teneur en lipides des tissus (f) :

$$C_i = \frac{C_t}{f}$$

Pour les moules encagées, dans le cadre du RINBIO l'indice de condition des organismes est également calculé. Il constitue selon lui un bon indicateur de l'état physiologique (réserves énergétiques, croissance tissulaire, stade sexuel) des coquillages. Cet indice permet de comparer les résultats des concentrations en contaminants dans les tissus des moules encagées en fonction des sites d'études et de leurs conditions trophiques. L'indice de condition est déterminé sur la base du poids de chair sèche et sera calculé à partir de l'indice de Lawrence & Scott selon l'équation suivante :

$$\text{Indice de Condition (\%)} = \frac{\text{poids sec de chair}}{\text{poids sec de coquilles}} \times 100$$

Au terme de cette étude, il sera possible de déterminer différents BAF : BAF_{total}, BAF_{référence} et un BAF pour chaque échantillonneur passif :

- Un BAF_{total} basé sur la concentration totale du contaminant dans l'eau mesurée par la méthode classique ;
- Un BAF_{référence} basé sur la concentration dissoute (filtration à 0,45 µm pour les composés organiques et pour les métaux) du contaminant mesurée par la méthode classique ;
- Un BAF_{SBSE total} basé sur la concentration totale du contaminant dans l'eau mesurée par la méthode SBSE ;
- Un BAF_{SBSE dissous} basé sur la concentration dissoute (filtration à 0,45 µm pour les composés organiques) du contaminant mesurée par la méthode SBSE ;
- Un BAF_{DGT} ou BAF_{DGT Hg} basé sur la concentration du contaminant dans l'eau déterminée à partir des mesures par DGT ou DGT Hg pour le mercure ;
- Un BAF_{membrane silicone} basé sur la concentration du contaminant dans l'eau déterminée à partir de la concentration mesurée dans les membranes silicone.

Pour le TBT et ses composés, aucune valeur de BAF terrain ne pourra être déterminée puisqu'aucune acquisition de données dans l'eau n'est possible dans le cadre de cette étude.

Suivant les résultats disponibles au terme de cette étude, les BAF pour chaque substance seront déterminés par façade et pour chacun des points de suivi avant traitement complémentaire éventuel notamment le calcul d'un BAF_{référence} national. Ils seront exprimés en poids humide de chair des organismes. Si une conversion poids sec - poids humide est nécessaire, le taux de matière sèche mesuré dans l'échantillon sera utilisé.

Les résultats obtenus permettront de mettre en évidence les éventuelles différences existantes entre les moules sauvages et les moules encagées. Néanmoins, il n'est pas envisagé, à priori, de déterminer un BAF basé sur les moules sauvages ou sur les moules encagées. L'ensemble des données au sein d'un même point seront poolées pour calculer le C_{moules}.

4. Budget

Le budget évalué par point de suivi et par année (2016 à 2018) est indiqué tableau 5. Ce bilan prend en compte uniquement la partie analyse des échantillons d'eau et de moules, ainsi que l'achat, la préparation avant exposition et l'analyse des échantillonneurs passifs.

L'analyse des échantillons d'eau par les techniques analytiques classiques représente un coût important. En effet, l'acquisition de données par ces techniques nécessite des opérations d'échantillonnage complexes et un important traitement de l'échantillon pour concentrer et purifier les contaminants recherchés, impliquant une consommation importante de matériel et de temps pour le personnel spécialisé (Mazzella et al., 2011). De plus, les méthodes analytiques employées respectent les recommandations de la DCE 2013 (LQ = NQE/3) mais ne garantissent en rien l'obtention d'un résultat final quantifié. **De ce fait, en fonction des résultats obtenus en 2016 pour la façade**

Manche-Mer du Nord, l'analyse de la matrice eau *via* les méthodes classiques ne sera pas obligatoirement reconduite en 2017 et 2018. Si elle ne l'est pas, les échantillonnages d'eau seront uniquement réalisés par l'intermédiaire des échantillonneurs passifs (SBSE, DGT et membrane silicone).

Documents de référence

ACTA, 2015. Index phytosanitaire ACTA, le réseau des instituts des filières animales et végétales, 984 p..

Amouroux I., Claisse D., 2015. Opérations d'échantillonnage en milieu marin dans le cadre des programmes de surveillance chimique. Matrices eau, sédiment et biote. Recommandations techniques AQUAREF. Version 2015, 22 p..

Andral B., 2002. Guide méthodologique. Le réseau Intégrateurs Biologiques (RINBIO) en Méditerranée. Evaluation de la contamination chimique basée sur l'utilisation de stations artificielles de moules. Ifremer, mars 2002, 21 p..

Andral B., Galgani F., Tomasino C., Blottiere C., 2007. Projet INTERREG III B – MYTILOS. Evaluation de la contamination chimique de la Méditerranée Occidentale par la méthode des transplants de moules. Juin 2007.

Andral B., Stanisiere J. Y., Cossa D., Abarnou A., Claisse D., Joanny M., Lebec C., Angeli J. P., Henocque H., Romana L. A., 1997. Réseau Intégrateurs Biologiques. RINBIO : étude de la contamination chimique du milieu littoral méditerranéen. Rapport de contrat dans le cadre de la Convention n° 95095 pour l'Agence de l'Eau RMC, Ifremer Toulon.

Andral B., Stanisiere J. Y., Sauzade D., Damier E., Thebault H., Galgani F., Boissery P., 2004. Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. Marine Pollution Bulletin, N° 49, pp. 704-712.

AQUAREF, 2010. Substances de la directive cadre eau. Fiches substances validées. Fiche diphenyléthers bromés. http://www.aquaref.fr/substances_validees

ASTM, 2013a. Standard Guide for Conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Mollusks. E1022-94 (reapproved 2013), American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, Penn.

ASTM, 2013b. Standard Guide for Conducting In-Situ Field Bioassays with Caged Bivalves. Designation E2122-02, American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, Penn, reapproved 2013, 30 p..

Belin C., Claisse D., Daniel A., Fleury E., Miossec L., Piquet J.C., Ropert M., Boisseaux A., Lamoureux A., Soudant D., 2015. Qualité du milieu marin littoral. Synthèse nationale de la surveillance 2013. Édition 2015. Rapport Ifremer, ODE/DYNECO/VIGIES/15-07, mars 2015, 75 p..

Booij K., Robinson C. D., Burgess R. M., Mayer P., Roberts C. A., Ahrens L., Allan I. J., Brant J., Jones L., Kraus U. R., Larsen M. M., Lepom P., Petersen J., Proefrock D., Roose P., Schaefer S., Smedes F., Tixier C., Vorkamp K., Whitehouse P. 2016. Passive Sampling in Regulatory Chemical Monitoring of Nonpolar Organic Compounds in the Aquatic Environment. *Environ. Sci. Technol.*, 50, 3–17.

Boucart C., Lubet P., 1964. Cycle sexuel et évolution des réserves chez *Mytilus Galloprovincialis* lamarck (mollusque bivalve). CIESM Congress Monaco, p. 156-158.

- Bristeau S., 2011. Surveillance des résidus de médicaments dans les eaux : stabilité dans les échantillons et distribution entre fractions dissoute et particulaire. Rapport AQUAREF 2011, 53p..
- Casas S., 2005. Modélisation de la bioaccumulation de métaux traces (Hg, Cd, Pb, Cu et Zn) chez la moule, *Mytilus galloprovincialis*, en milieu méditerranéen. Thèse de doctorat. Université du sud – Toulon – Var (France), 314 p.
- Claisse D., 2012. Cahier des spécifications techniques et méthodologiques ROCCH sanitaire. Ifremer, édition 2012, 29 p.
- DCE, 2013. Directive 2013/39/UE du Parlement européen et du Conseil du 12/08/2013 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.
- EC, 2011. Technical Guidance for Deriving Environmental Quality Standards (TGD-EQS). Guidance Document No. 27 for the Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive (2000/60/EC). Technical Report – 2011 – 055.
- European Commission, 2016. EU Pesticides database : <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN>, dernière version le 07.04.2016.
- Gonzalez J. L., Bouchoucha M., Chiffolleau J. F., Andral B., 2013. Surveillance de la contamination chimique en Méditerranée : calibrage du capteur moule. Rapport Ifremer, RST.ODE/LER-PAC/13-01, janvier 2013, 114 p.
- Gonzalez J-L., Foan L., 2015. Evaluation de la contamination des eaux : comparaison des mesures par échantillonneurs passifs (DGT, POCIS, SBSE) et des mesures dans le biote. Etat de l'art et bilan des données. Rapport AQUAREF 2015, 76 p.
- Gonzalez J-L., Foan L., Togola A., Uher E., Guyomarch J., Munaron D., Tapie N. et Budzinski H., 2015. Bilan des opérations "grande échelle" (utilisation des échantillonneurs passifs DGT, POCIS, SPMD, SBSE) : substances DCE et pharmaceutiques. Rapport final AQUAREF 2015, 96 p.
- Mackay D., Fraser A., 2000. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environmental Pollution* 110, 375-391. Mazzella N., Coquery M., Miège C., Berho J-P., Togola A., Gonzalez J-L., Tixier C., Lardy-Fontan S., 2011. Applicabilité des échantillonneurs passifs dans le cadre de la DCE. Irstea, 80 p.
- Mazzella N., Coquery M., Miège C., Berho C., Ghestem J.P., Togola A., Gonzalez J.L., Tixier C., Lardy-Fontan S., 2011. Applicabilité des échantillonneurs passifs dans le cadre de la DCE. Action II-B01 – Développement et optimisation des technologies innovantes de prélèvement et d'analyse. Irstea, 80 p.
- Miège C., Mazzella N., Coquery M., Tixier C., Gonzalez J-L., Ghestem J-P., Togola A., Lardy-Fontan S., 2014. Position du groupe AQUAREF sur la question de l'utilisation des échantillonneurs intégratifs passifs (EIP) pour le prochain cycle de surveillance (2015-2021). Rapport d'étape AQUAREF-Irstea, 2014, 23 p.

OSPAR, 2012. Lignes directrices JAMP de la surveillance des contaminants dans le milieu vivant. Référence No. 1999-02, révision en 2012, 132 p.

OSPAR, 2013. JAMP guideline on monitoring of contaminants in seawater. Agreement 2013-03, 19 p.

Poulier G., 2014. Etude de l'échantillonnage intégratif passif pour l'évaluation réglementaire de la qualité des milieux aquatiques : application à la contamination en pesticides et en éléments trace métalliques des bassins versants du Trec et de l'Auvézère. Ingénierie de l'environnement. Université de Limoges, 2014. Français.

RNO, 2006. Surveillance du Milieu Marin. Travaux du RNO. Edition 2006. Ifremer et Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable. ISSN 1620-1124.

Sargian P., Andral B., 2013. RINBIO 2012 – Evaluation de la qualité des eaux base sur l'utilisation de stations artificielles de moules en Méditerranée : résultats de la campagne 2012. Rapport Ifremer, RST.ODE/UL/LER-PA/13-25, décembre 2013, 92 p.

Sire A., Amouroux I., 2015. Détermination de Valeurs Guides Environnementales (VGE) mollusques alternatives aux Normes de Qualités Environnementales (NQE) eau définies dans la DCE. Rapport Ifremer, janvier 2016, 81 p.

Tronczński J., Munsch C., Héas-Moisan K., Guiot N., Truquet I., 2005. Analyse de contaminants organiques (herbicides, PCB, OCP, HAP) dans les eaux estuariennes et marines côtières. Edition Ifremer, Méthodes d'analyse en milieu marin, 52 p.

US EPA, 2000. Methodology for deriving ambient water quality criteria for the protection of human health (2000). United States Environmental Protection Agency. EPA-822-B-00-004, october 2000.

US EPA, 2003. Methodology for deriving ambient water quality criteria for the protection of human health (2000). Technical support document, volume 2: development of national bioaccumulation factors. United States Environmental Protection Agency. EPA-822-R-03-030, december 2003.

US EPA, 2009. Methodology for deriving ambient water quality criteria for the protection of human health (2000). Technical support document, volume 3: development of site-specific bioaccumulation factors. United States Environmental Protection Agency. EPA-822-R-09-008, september 2009.

Annexe 1 : Devis d'analyses : caractéristiques techniques Alpa Chimies et Cèdre

Méthodes de mesure et d'analyse :

Matrice analysée : Eaux de mer

Paramètres	Méthodes	Seuils de quantification	Code Flacon
<i>Flaconnage : Flacon mercure (IALP004) 40 mL x 1 :</i>			
* Mercure	NF EN ISO 17852	0.005 µg/L	
<i>Flaconnage : Flacon métaux pour les eaux de mer (I) 250 mL x 1 :</i>			
* Cadmium	NF EN ISO 17294-2	0.10 µg/L	
* Plomb	NF EN ISO 17294-2	0.2 µg/L	
<i>Flaconnage : Litre verre pesticides LC (IALP013) 1000 mL x 1 :</i>			
Irgarol 1051 (cybutryne)	LC/MS/MS	0.005 µg/L	
<i>Flaconnage : Litre verre chlorophénols (IALP013) 1000 mL x 1 :</i>			
Pentachlorophénol	NF EN 12673	0.010 µg/L	
<i>Flaconnage : Litre verre pesticides GC (IALP013) 1000 mL x 1 :</i>			
Diéthylhexylphthalate (DEHP ou DOP)	GC/MS	0.30 µg/L	
<i>Flaconnage : Litre verre BDE+C10C13 (IALP013) 1000 mL x 1 :</i>			
Chloroalcanes C10-C13	GC/MS-CInégative	10.0 µg/L	
Alkylphénols			
<i>Flaconnage : Litre verre pesticides GC (IALP013) 1000 mL x 1 :</i>			
4-n-nonylphénol	GC/MS	0.010 µg/L	
4-n-octylphénol	GC/MS	0.010 µg/L	
4-para-nonylphénol	GC/MS	0.10 µg/L	
4-tert-octylphénol	GC/MS	0.010 µg/L	
Nonylphénol (mélange technique)	GC/MS	0.10 µg/L	
Hydrocarbures polycycliques aromatiques			
<i>Flaconnage : Litre verre HAP (IALP013) 1000 mL x 1 :</i>			
* Anthracène	NF EN ISO 17993	0.005 µg/L	
* Naphtalène	NF EN ISO 17993	0.020 µg/L	
Organoétains			
<i>Flaconnage : Flacon 250 mL pour organoétains (I) 250 mL x 1 :</i>			
* Dibutylétain (DBT)	NF EN ISO 17353 mod.	0.002 µg Sn/L	
* Monobutylétain (MBT)	NF EN ISO 17353 mod.	0.002 µg Sn/L	
* Tributylétain (TBT)	NF EN ISO 17353 mod.	0.002 µg Sn/L	
Pesticides			
<i>Flaconnage : Litre verre pesticides GC (IALP013) 1000 mL x 1 :</i>			
Aclonifen	Liq/liq - GC/MS/MS	0.010 µg/L	
Bifenox	Liq/liq - GC/MS/MS	0.010 µg/L	
Chlorfenvinphos	Liq/liq - GC/MS/MS	0.020 µg/L	
* Chlorpyrifos éthyl	Liq/liq - GC/MS/MS	0.010 µg/L	
Quinoxifène	Liq/liq - GC/MS/MS	0.030 µg/L	
* Terbutryne	Liq/liq - GC/MS/MS	0.010 µg/L	
Trifluraline	Liq/liq - GC/MS/MS	0.010 µg/L	
<i>Flaconnage : Litre verre pesticides GC (IALP013) 1000 mL x 1 :</i>			
* Aldrine	NF EN ISO 6468	0.001 µg/L	
* alpha-HCH	NF EN ISO 6468	0.001 µg/L	
* beta-HCH	NF EN ISO 6468	0.001 µg/L	
Cyperméthrine	NF EN ISO 6468	0.010 µg/L	
* DDD pp'	NF EN ISO 6468	0.001 µg/L	
* DDE pp'	NF EN ISO 6468	0.001 µg/L	
* DDT op'	NF EN ISO 6468	0.001 µg/L	
* DDT pp'	NF EN ISO 6468	0.001 µg/L	
delta-HCH	NF EN ISO 6468	0.001 µg/L	
* Dieldrine	NF EN ISO 6468	0.001 µg/L	

Paramètres	Méthodes	Seuils de quantification	Code Flacon
* Endosulfan alpha	NF EN ISO 6468	0.001 µg/L	
* Endosulfan beta	NF EN ISO 6468	0.001 µg/L	
* Endrine	NF EN ISO 6468	0.001 µg/L	
* gamma-HCH (Lindane)	NF EN ISO 6468	0.001 µg/L	
Isodrine	NF EN ISO 6468	0.001 µg/L	
Pentachlorobenzène	NF EN ISO 6468	0.010 µg/L	
Solvants par PaT/GC/MS			
<i>Fiaconnage : Flacon PaT (IALP015) 40 mL x 2 :</i>			
1,2,3-trichlorobenzène	NF EN ISO 15680	0.10 µg/L	
1,2,4-trichlorobenzène	NF EN ISO 15680	0.10 µg/L	
1,3,5-trichlorobenzène	NF EN ISO 15680	0.10 µg/L	

Matrice analysée : Matières vivantes

Paramètres	Méthodes	Seuils de quantification	Code Flacon
Cadmium	ICP-MS	0.05 mg/kg/sec	
Mercure	Vapeurs froides-fluo.atomique	0.01 mg/kg/sec	
Plomb	GFAAS	0.1 mg/kg/sec	
Pentachlorophénol	GC/MS	100 µg/kg/sec	
C10-13 chloroalcanes	GC/MS-CInégative	10.0 mg/kg/sec	
Alkylphénols			
4-n-nonylphénol	GC/MS	10.0 µg/kg/sec	
4-n-octylphénol	GC/MS	10.0 µg/kg/sec	
4-para-nonylphénol	GC/MS	100 µg/kg/sec	
4-tert-octylphénol	GC/MS	10.0 µg/kg/sec	
Nonylphénol (mélange technique)	GC/MS	1000 µg/kg/sec	
Hydrocarbures polycycliques aromatiques GC/HRMS			
Anthracène	GC/HRMS	µg/kg/sec	
Naphtalène	GC/HRMS	µg/kg/sec	
Organo-étains			
Dibutylétain (DBT)	GC/MS	2.0 µg Sn/kg/sec	
Monobutylétain (MBT)	GC/MS	2.0 µg Sn/kg/sec	
Tributylétain (TBT)	GC/MS	2.0 µg Sn/kg/sec	
Pesticides par GC/HRMS			
44' DDD	GC/HRMS	µg/kg/sec	
44' DDE	GC/HRMS	µg/kg/sec	
44' DDT	GC/HRMS	µg/kg/sec	
Aldrine	GC/HRMS	µg/kg/sec	
Dieldrine	GC/HRMS	µg/kg/sec	
Endosulfan alpha	GC/HRMS	µg/kg/sec	
Endosulfan bêta	GC/HRMS	µg/kg/sec	
HCH alpha	GC/HRMS	µg/kg/sec	
HCH bêta	GC/HRMS	µg/kg/sec	
HCH delta	GC/HRMS	µg/kg/sec	
Isodrin	GC/HRMS	µg/kg/sec	
Lindane (HCH gamma)	GC/HRMS	µg/kg/sec	
Irgarol 1051	GC/HRMS	µg/kg/sec	
Quinoxifène	GC/HRMS	µg/kg/sec	
Terbutryne	GC/HRMS	µg/kg/sec	
Chlorfenvinphos	GC/HRMS	µg/kg/sec	
Chlorpyrifos éthyl	GC/HRMS	µg/kg/sec	
Aclonifen	GC/HRMS	µg/kg/sec	
Bifenox	GC/HRMS	µg/kg/sec	
Cypermethrine	GC/HRMS	µg/kg/sec	
Endrine	GC/HRMS	µg/kg/sec	
Pentachlorobenzène	GC/HRMS	µg/kg/sec	

Paramètres	Méthodes	Seuils de quantification	Code Flacon
Trifluraline	GC/HRMS	µg/kg/sec	
Diethylhexylphthalate	GC/HRMS	µg/kg/sec	
1,2,3-trichlorobenzène	GC/HRMS	µg/kg/sec	
1,2,4-trichlorobenzène	GC/HRMS	µg/kg/sec	
1,3,5-trichlorobenzène	GC/HRMS	µg/kg/sec	

L'accréditation du COFRAC atteste de la compétence du laboratoire pour les seuls essais couverts par l'accréditation qui sont identifiés par le symbole (*).

Suite à la mise en place du LAB GTA 05 (*), nous vous informons que le rendu des rapports sous accréditation COFRAC (portée d'accréditation n° 1-1351) ne sera possible qu'en cas d'utilisation de flaconnage adapté.

Il est nécessaire lors de la transmission de vos demandes d'analyses d'indiquer la date et heure du prélèvement sur le document accompagnant ou sur le flaconnage, les échantillons doivent nous parvenir sous 24 heures et maintenus lors du transport à une température de 5°±3°C

Flacons (par échantillon) :

Echantillon : Eau de mer

Code flacon	Libellé flacon	Nombre
ALP004	Flacon 40 mL verre blanc + mousse/téflon	1
ALP013	Flacon 1 L verre + 31.5 mm mousse/téflon + 24 mg de thiosulfate de sodium	5
ALP015	Flacon 40 mL verre brun + mousse/téflon + 3.5 mg de thiosulfate de sodium	2
I	Flacon carré étiqueté 250 mL aseptique sans thio	2

Note Importante :

Les flacons peuvent contenir des stabilisants, ils ne doivent pas être rincés avant remplissage.

IFREMER

Proposition P.16059

PROJET BAF BIOTE *IN SITU*

ANALYSE D'ECHANTILLONS D'EAU PAR SBSE-GC-MS/MS

A la demande de l'IFREMER, le Cedre propose de quantifier divers composés dans des échantillons d'eau, avec et sans filtration. Les prélèvements seront réalisés par des agents de l'IFREMER et expédiés congelés au Cedre.

Pour 2016, il est prévu 3 sites de prélèvements, 500 mL d'eau étant prélevé à chaque station. Pour chaque station, une extraction sera réalisée en triplicat sur l'eau brute, ainsi qu'une extraction en triplicat sur l'eau filtrée (0.45 µm filtre fibre de verre pyrolysés). La filtration sera réalisée au Cedre.

Pour chaque station, 6 analyses SBSE et 1 filtration seront réalisées. Ce dimensionnement concerne les composés apolaires ne nécessitant pas d'étape de dérivation *in situ*.

Les dérivés des phénols peuvent être extraits directement mais la méthode de choix est après dérivation *in situ*, ce qui permet d'abaisser les limites de quantification.

De même, pour le tributylétain (TBT) et les dérivés du mercure, un autre type de dérivation *in situ*. Enfin, la présente proposition propose de réaliser des développements analytiques sur des molécules *a priori* analysables par la technique, sans dérivation *in situ*, et qui pourraient être intégrées à la première extraction.

Le détail des différentes molécules cibles est présenté dans le tableau qui suit.

Filtrations et analyse des composés apolaires

Consommables

Analyse des dérivés des phénols

Analyse des organo-métalliques

Développements analytiques.....

(dont consommables)

Le 29 juin 2016
Julien GUYOMARCH
Responsable du service Analyses et Moyens

Liste des molécules cibles

Substance	N° CAS	Développé	Faisable	Dérivation <i>in situ</i>
Isodrine	465-73-6	Oui		
pp' DDT	50-29-3	Oui		
op' DDT	789-02-6	Oui		
pp' DDE	72-55-9	Oui		
pp' DDD	72-54-8	Oui		
Dieldrine	60-57-1	Oui		
Endrine	72-20-8	Oui		
Hexachlorocyclohexane	319-84-6 319-85-7 58-89-9 319-86-8	Oui		
Anthracène	120-12-7	Oui		
Chlorfenvinphos	470-90-6	Oui		
Chlorpyrifos	2921-88-2	Oui		
Naphtalène	91-20-3	Oui		
Nonylphénols (4-Nonylphénol ramifié)	104-40-5	Oui		✓
Pentachlorophénol	87-86-5	Oui		✓
Trifluraline	1582-09-8		Oui	
Di(2-ethylhexyl)phtalate		Oui		
Aldrine	303-00-2	Oui		
Octylphénols (4-(1,1',3,3'-tétraméthylbutyl)-phénol)	140-66-9	Oui		✓
Pentachlorobenzène	608-93-5		Oui	
Quinoxylène	124495-18-7		Oui	
Aclonifène	74070-46-5		Oui	
Bifénox	42576-02-3		Oui	
Cybutryne (Irgarol)			Oui	
Cypermethrine			Oui	
Endosulfan (alpha et beta)	959-98-8 33213-65-9	Oui		
PBDE			Oui	
Mercure et ses composés			Oui	
Trichlorobenzène			Oui	
Composés du tributylétain (tributylétain-cation)	1461-25-2	Oui		✓
Terbutryne	886-50-0	Oui		
Chloroalcanes, C10-13			Oui	

Annexe 2 : Moules engagées : Protocole de préparation en amont de la mise en place de l'essai terrain

1. Sélection des moules

Les moules utilisées pour les essais doivent avoir un **patrimoine génétique homogène**, pour cela elles doivent toutes être issues de la même population. Les modalités de préparation amont du caging sont précisées en annexe 1, basées sur la méthodologie RINBIO et normes ASTM E2122-02. Elles peuvent être prélevées directement sur le terrain sur un site exempt de toute contamination, ou peuvent provenir de fermes de culture.

Toutes les moules utilisées doivent avoir la **même classe d'âge** : de 18 à 24 mois et **une taille aussi uniforme** que possible : $50 \text{ mm} \pm 5 \text{ mm}$. Pour sélectionner la cohorte désirée le calibrage est réalisé sur la hauteur de la coquille en utilisant une calibreuse à grille de 19 mm. Un double calibrage est recommandé pour obtenir une cohorte homogène. Cette opération peut engendrer une mortalité de 20 à 25%, mais cela permet de minimiser la variabilité des résultats au terme de l'essai.

Le nombre de moules nécessaire correspond au nombre total de moules utilisées pour les analyses sur l'ensemble de la période d'immersion. A ce nombre, il faut rajouter 20 à 50% d'individus supplémentaires pour pallier aux éventuelles mortalités pouvant survenir pendant l'essai ou aux éventuels organismes blessés. Enfin, il faut également ajouter un nombre d'organismes qui seront utilisés pour réaliser les analyses préopératoires qui permettront de connaître le niveau de contamination initial des moules (avant implantation).

2. Préparation des moules avant mise en place sur le terrain

Une fois que les moules sont sélectionnées sur le site de référence, elles sont transportées au laboratoire pour la préparation du caging. Si les moules sont placées dans de l'eau propre, celle-ci doit être maintenue à une température constante et proche de la température des points de suivi. En effet, une augmentation rapide de la température de l'eau pour des organismes adultes pourrait induire la ponte et donc fausser les résultats de l'essai.

Une fois les moules placées dans les cages, elles sont de nouveau immergées sur leur site d'origine pendant 15 jours avant la mise en œuvre de la campagne pour permettre aux moules de se regagner dans de bonnes conditions et éviter un stress supplémentaire lors des différentes manipulations occasionnées par les opérations de pose.

Enfin, avant d'être déplacée sur les points d'étude choisis, un échantillon de 30 moules minimum dans chaque « cage mère » sera constitué pour être analysé afin de connaître la concentration initiale des différentes substances recherchées. Cette analyse initiale sera considérée comme représentative de l'ensemble du lot.

3. Mise en place sur le terrain

Tous les équipements y compris les cages, les glacières, les tubes ... qui sont en contact avec l'eau ou les mollusques ne doivent pas contenir des substances qui pourraient être lessivées ou dissoutes dans des solutions aqueuses. Cela pourrait provoquer une accumulation de ces contaminants dans les tissus des organismes et/ou provoquer des effets toxiques. En complément, les équipements doivent être choisis pour minimiser la sorption sur leurs surfaces des substances présentes dans les échantillons analysés.

Les cages :

Il existe différents types de cages adaptées aux essais sur le terrain, la norme ASTM E2122-02 (2013) recommande l'utilisation de cages compartimentées car cela permet :

- une ouverture efficace des valves ;
- une bonne croissance des organismes durant l'essai ;
- une exposition homogène des organismes aux contaminants.

Le mouillage :

Différentes stratégies peuvent être employées pour le mouillage en fonction du résultat que l'on souhaite acquérir. Pour cette étude, c'est **le mouillage de surface** qui est utilisé car il permet d'obtenir des données proches de la surface. Différents paramètres doivent être pris en compte afin de positionner les cages à la bonne profondeur dans la colonne d'eau :

- la hauteur de la marée, afin que les cages soient en permanence immergées ;
- la pente de fond, il est nécessaire de s'assurer que les cages ne glissent pas sur une pente raide pendant la durée du test ;
- les activités nautiques et les activités de loisirs, qui pourraient endommager les cages. Dans ce cas, il est possible de doubler voire tripler le mouillage pour optimiser le pourcentage de récupération des échantillons.

Pour la détermination de BAF « terrain » les poches ostréicole conjointes seront placées à – 6m de la surface de l'eau, à l'aide d'une ligne fixée à la structure d'ancrage.

A chaque point de suivi, les 3 poches ostréicole filles conjointes sont accrochées à **des mouillages fixés de types** « phares et balises », tel que des parcs mytilicoles, des tables ostréicoles, des récifs artificiels ou encore des bouées de balisage pour les zones portuaires. Cela permet de garantir un meilleur pourcentage de récupération des cages et facilite les prélèvements réguliers. Des études sur les possibles interactions de ces structures sur les analyses chimiques et les relargages éventuels de contaminants par l'ensemble de ces dispositifs ont été réalisées dans le cadre de la thèse de S. Casas (2005)¹ et les interactions ont été considérées comme négligeables compte tenu de la position dans la colonne d'eau.

¹ Casas S., 2005. Modélisation de la bioaccumulation de métaux traces (Hg, Cd, Pb, Cu et Zn) chez la moule, *Mytilus galloprovincialis*, en milieu méditerranéen. Thèse de doctorat. Université du sud – Toulon – Var (France), 314 p..



Onema

Hall C – Le Nadar
5 square Félix Nadar
94300 Vincennes
01 45 14 36 00
www.onema.fr

Ifremer

Rue de l'Île d'Yeu
BP 21105
44311 Nantes cedex 3
02 40 37 40 00
wwz.ifremer.fr/