



Accréditation n°3-1004, Inspection
Portée disponible sur www.cofrac.fr

DECLARATION DE VERIFICATION ETV – Environmental Technology Verification

Entreprise	BIOMAE	N° d'enregistrement	VN20180033
Technologie	Protocole de réalisation des bioessais actifs <i>in situ</i> à partir de gammares engagés	Date de délivrance	14/01/2019

Description du produit

La société BIOMAE, en collaboration avec l'équipe d'écotoxicologie d'IRSTEA de Lyon a développé une méthode de biosurveillance active (transplantation d'organismes vivants) permettant de mesurer *in situ* la contamination chimique biodisponible des micropolluants (métaux et composés organiques) et la toxicité des milieux aquatiques. Les bioessais actifs *in situ* sont réalisés sur des organismes vivants prélevés dans un espace naturel confiné propriétaire contrôlé. Ces organismes vivants, appelés gammares, sont des crevettes d'eau douce, invertébré, polluosensibles et accumulateur de micropolluants chimiques (métaux et organiques). Ces organismes ne sont pas invasifs en Europe.

Post prélèvement, ces organismes sont conditionnés en laboratoire sur une certaine période (stabulation), puis exposés par une technique d'engagement directement dans le milieu récepteur (rivières, fleuves, canaux comme par exemple des stations de surveillance, « amont - aval » d'un rejet industriel, etc.). La durée d'exposition dépend du type de bioessai.

Post exposition *in situ*, les gammares sont récupérés, analysés et interprétés à partir de référentiels de chimie et de toxicité uniques mis au point par des chercheurs de l'IRSTEA et co-construits avec les équipes de BIOMAE.

La vérification a été réalisée sur les étapes de stabulation et de calibration des gammares.

Paramètres vérifiés

Dans le cadre de cette vérification, les paramètres suivants ont été mesurés et vérifiés :

Pour les paramètres de performances :

- Concentrations maximales mesurées dans les organismes d'essai à la sortie de l'élevage pour les substances présentes dans la norme XP-T90-721 (Tableau 1)
- Performances physiologiques constantes des organismes d'essai au cours du temps (Tableau 2)

Pour les paramètres de fonctionnement tels que la température de l'eau, l'oxygène dissous, la conductivité, le pH, l'alimentation, la densité d'organismes, la fréquence de renouvellement du milieu, la photopériode, la durée de stabulation (Tableau 3 et 4).

José Alcorta, Rescoll

Gérant

05 47 74 69 00, etv@rescoll.eu
8 allée Geoffroy Saint Hilaire
33165 Pessac, France

Guillaume Jubeaux, BIOMAE

Président

06 78 76 93 54, guillaume.jubeaux@biomae.fr
ZA en Beauvoir, 320 rue de la Outrade, 01500
Château-Gaillard France

Tableau 1 : Concentrations maximales mesurées dans les organismes d'essai produits par BIOMAE à la sortie de l'élevage et celles définies dans la norme XP-T90-721.

Paramètre	Code Sandre	Unité (PF : poids frais)	Concentrations maximales dans les organismes d'essai (Cf. Norme XP T90-721)	Concentrations maximales mesurées dans les gammars BIOMAE (entre 2016 et 2017)
Dioxines et composés de type dioxine*	7707	µg/kg PF	0,0022	0,0018*
Fluoranthène	1191	µg/kg PF	5	2,83
Benzo (a) pyrène	1115	µg/kg PF	1,7	1,03
Di(2-ethylhexyle)phthalate (DEHP)	6616	µg/kg PF	100	<20
Hexachlorobenzène	1199	µg/kg PF	3	1,97
Perfluorooctane Sulfonate (PFOS)**	6560	µg/kg PF	3	<1**
Hexabromocyclododécane (HBCDD)*	7128	µg/kg PF	20	<10*
Pentachlorobenzène	1888	µg/kg PF	50	1,34
Dicofol	1172	µg/kg PF	10	3,24
Hexachlorobutadiène	1652	µg/kg PF	10	<0,2
Heptachlore	1197	µg/kg PF	20	<0,2
Heptachlore Epoxyde	1198	µg/kg PF	20	<2,5
Cadmium (Cd)	1388	mg/kg PF	0,05	0,01
Nickel (Ni)	1386	mg/kg PF	0,28	0,19
Plomb (Pb)	1382	mg/kg PF	0,17	0,03
PCB 153	1245	µg/kg PF	1,9	0,68
PCB 101	1242	µg/kg PF	1,5	0,69
PCB 180	1246	µg/kg PF	0,8	0,42
PCB 118	1243	µg/kg PF	1	0,37
PCB 28	1239	µg/kg PF	0,7	0,31
PCB 138	1244	µg/kg PF	1,5	0,50
4,4' DDE	1146	µg/kg PF	0,85	0,30
DDT 4,4'	1148	µg/kg PF	3,5	2,39

Rq : Les concentrations maximales mesurées proviennent de l'analyse de 24 lots de gammars à la sortie de l'élevage sur une période s'étalant de janvier 2016 à décembre 2017.

* : Les résultats ont été obtenus sur 9 lots de gammars.

** : Le résultat a été obtenu sur 19 lots de gammars.

Tableau 2 : Performances physiologiques constantes des organismes d'essai au cours du temps.

Paramètres physiologiques	Moyenne	Ecart type	Coefficient de variation (%)
Taille (mm)	11,3	0,8	7%
Taux de survie (%)	90,8	4,5	5%
Alimentation (mm ² /ind./j)	21,3	2,7	13%
Activité de l'acétylcholinestérase AChE (nmol/min)	9,0	1,0	11%
Fécondité (Nb d'embryons corrigé avec la taille des femelles)	2,9	0,6	19%***

Rq : Le coefficient de variation des paramètres physiologiques a été mesuré sur 20 lots de gammares sur une période s'étalant de mars 2016 à décembre 2017. La performance physiologique des organismes d'essai a été considérée comme constant au cours du temps pour les paramètres physiologiques possédant un coefficient de variation inférieur à 25%.

*** : Le coefficient de variation de la fécondité a été calculé sur 15 lots de gammares.

Tableau 3 : Paramètres de fonctionnement suivi lors de la stabulation pour les lots testés. Ces paramètres font référence aux conditions de stabulation vues par les gammares analysés.

Paramètres de fonctionnement	Conditions de stabulation	Conditions de stabulation observées sur les lots de gammares testés
Température de l'eau	7 à 20 °C	12 ± 2 °C
Oxygène dissous	>5 mg/L	>5 mg/L
Conductivité	[100 ; 1000]µS/cm	[100 ; 1000]µS/cm
pH	[6,3 ; 8,9]	[6,3 ; 8,9]
Alimentation	A volonté	A volonté
Densité d'organismes (Volume de gammares)	350 ± 25 mL	350 ± 25 mL
Fréquence de renouvellement du milieu	Une fois/24h	Une fois/24h
Photopériode	14h et 16h de jour et 10h et 8h de nuit	16h de jour et 8h de nuit
Durée de stabulation	Au moins 7 jours	Entre 11 et 17 jours
Conditionnement	Aquarium de 20L	Aquarium de 20L

Rq : Seul l'oxygène dissous est un paramètre critique pour maintenir les organismes d'essai en vie.

Tableau 4 : Paramètres de fonctionnement lors de l'exposition des organismes pour la mesure des paramètres physiologiques. Dans le cadre de la mesure des paramètres physiologiques, après la stabulation, le tri des organismes et la mise en cage, les organismes d'essai sont réimplantés dans la zone de stabulation (post-stabulation). Ces conditions d'exposition sont données ci-dessous :

Paramètres de fonctionnement lors de l'exposition pour la mesure des paramètres physiologiques	Conditions d'exposition observées sur les lots de gammares testés
Température de l'eau	14 ± 1 °C
Oxygène dissous	>5 mg/L
Conductivité	[100 ;1000]µS/cm
pH	[6,3 ;8,9]
Alimentation	Avec apport de nourriture contrôlé pour les mâles A volonté pour les femelles
Fréquence de renouvellement du milieu	Une fois/24h
Photopériode	16h de jour et 8h de nuit
Durée de stabulation	Entre 7 et 8 jours pour les tests de survie, d'alimentation et d'activité AChE Entre 20 et 25 jours pour les tests de fécondité
Conditionnement	(En cages percées d'une contenance de 180 mL) À raison de 4 cages de 20 gammares mâles pour les tests de survie, d'alimentation et d'activité AChE à raison de 4 cages de 7 gammares femelles pour les tests de fécondité

Application

Les bioessais de bioaccumulation s'appliquent dans le cadre du suivi et de la gestion de la qualité des cours d'eau encadrés par des directives telles que la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) qui fixent des objectifs de bon état chimique et écologique. Ces obligations réglementaires sont imposées aux états membres de l'Union Européenne.

Conception des tests et des analyses

Les résultats de la vérification proviennent de données existantes qui ont été acceptées par RESCOLL. Les essais ont été menés par 2 laboratoires différents.

La Drôme Laboratoire situé à Valence a réalisé les analyses pour les composés appartenant aux familles suivantes :

- Métaux (dont Cadmium, Nickel et Plomb)
- Chlorobenzène
- Hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP)
- Polychlorobiphényle (PCB)
- Pesticides organochlorés et organophosphorés
- Polybromodiphényléther (DPE)
- Sulfonate de perfluorooctane

Ce laboratoire est accrédité selon la norme NF EN ISO/CEI 17025 : 2005 (accréditation n°1-0852) pour la détermination de résidus de pesticides et de contaminants organiques ainsi que pour l'analyse d'éléments traces métalliques présents dans les crustacés (gammares). Ce laboratoire dispose par ailleurs d'une portée flexible pour ce type d'analyses.

La société BIOMAE situé à Château-Gaillard a réalisé des essais pour la détermination des paramètres listés ci-après :

- La taille
- La survie
- Le taux d'alimentation
- L'acétylcholinestérase
- La fécondité

La société BIOMAE a été audité par RESCOLL selon les exigences du GVP afin de s'assurer que le système de test du laboratoire répond à ces mêmes exigences et pour déterminer le niveau de qualité des données existantes.

Informations additionnelles*

Aucune information additionnelle n'a été fournie par BIOMAE.

**Ces informations sont fournies par l'entreprise à titre informatif et n'ont pas été vérifiées par l'Organisme de Vérification Rescoll*

Assurance qualité et écarts

La vérification a été conduite suivant le plan d'assurance qualité décrit dans le protocole de vérification spécifique.

Un audit du système de test de la société BIOMAE a été réalisé par RESCOLL afin d'évaluer l'acceptabilité des données existantes et le système de test.

Par ailleurs, RESCOLL applique, lors de ses vérifications ETV, l'ensemble des exigences de la norme ISO 17020 ainsi que l'ensemble des exigences du GVP.

Deux déviations par rapport au protocole de vérification spécifique ont été relevées (cf rapport de vérification). Ces déviations n'affectent pas le calcul des paramètres de performances. Aucune de ces déviations n'a été considérée comme ayant un impact significatif sur la vérification.

Tous les détails de la vérification sont consignés dans le rapport de vérification disponible sur demande à BIOMAE.