



HAL
open science

Recherche et développement dans le domaine des substances chimiques : préparation aux réponses du système REACH

Jean-Baptiste Baugros

► **To cite this version:**

Jean-Baptiste Baugros. Recherche et développement dans le domaine des substances chimiques : préparation aux réponses du système REACH. Chimie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2008. Français. NNT: . tel-00371357

HAL Id: tel-00371357

<https://theses.hal.science/tel-00371357>

Submitted on 27 Mar 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON
Délivrée par
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1
ECOLE DOCTORALE DE CHIMIE

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

par

Jean-Baptiste BAUGROS

Spécialité : Chimie Analytique

***Recherche et développement dans le domaine des
substances chimiques : préparation aux réponses du
système REACH***

Soutenue publiquement le 18 décembre 2008

Directeur de thèse : Mme Grenier-Loustalot et M. Lantéri

JURY :

M. Barcelo D : Directeur de l'Institut de recherches chimiques et environnementales
de Barcelone - Rapporteur

M. Rudaz S : Université de Genève - Rapporteur

Mme Grenier-Loustalot M-F : Directeur de recherche CNRS - Directeur de Thèse

M. Lantéri P : Professeur de l'Université Claude Bernard Lyon 1 – Directeur de Thèse

Mme Cren-Olivé C : Chargée de recherche CNRS – Examineur

M. Lebrun J-J : Directeur du Service Central d'Analyse du CNRS – Examineur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université

Vice-président du Conseil Scientifique
Vice-président du Conseil d'Administration
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie
Universitaire
Secrétaire Général

M. le Professeur L. COLLET

M. le Professeur J.F. MORNEX
M. le Professeur J. LIETO
M. le Professeur D. SIMON
M. G. GAY

SECTEUR SANTE

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec
UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche
UFR de Médecine Lyon-Nord
UFR de Médecine Lyon-Sud
UFR d'Odontologie
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M. le Professeur P. COCHAT
Directeur : M. le Professeur X. MARTIN
Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY
Directeur : M. O. ROBIN
Directeur : M. le Professeur F. LOCHER

Institut Techniques de Réadaptation

Directeur : M. le Professeur MATILLON

Département de Formation et Centre de Recherche en
Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

SECTEUR SCIENCES

Composantes

UFR de Physique
UFR de Biologie
UFR de Mécanique
UFR de Génie Electrique et des Procédés
UFR Sciences de la Terre
UFR de Mathématiques
UFR d'Informatique
UFR de Chimie Biochimie
UFR STAPS
Observatoire de Lyon
Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur
de Lyon
IUT A
IUT B
Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : Mme. le Professeur S. FLECK
Directeur : M. le Professeur H. PINON
Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Directeur : M. le Professeur G. CLERC
Directeur : M. le Professeur P.
HANTZPERGUE
Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN
Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Directeur : Mme. le Professeur H. PARROT
Directeur : M. C. COLLIGNON
Directeur : M. le Professeur R. BACON
Directeur : M. le Professeur J. LIETO
Directeur : M. le Professeur M. C. COULET
Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE
Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Service Central d'Analyse du CNRS (USR 059), placé sous la direction de Madame Marie-Florence GRENIER-LOUSTALOT, directeur de recherche au CNRS et déléguée régionale Côte d'Azur. Je tiens à lui exprimer mes plus profonds remerciements pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir confié ce projet de thèse. Je lui exprime ma plus grande reconnaissance pour tout le temps qu'elle a pu consacrer, pour ses conseils scientifiques et ses corrections afin que ce travail soit récompensé et présenté jusqu'à un niveau international.

Je remercie également Monsieur Pierre LANTERI, Professeur à l'Université Claude Bernard Lyon 1, d'avoir co-dirigé cette thèse, ses conseils et ses recommandations ont été essentiels à la bonne finition de ce travail. Son aide pour le traitement statistique m'a été d'une grande importance, je lui adresse mon plus grand respect scientifique.

Je remercie également le Cluster de recherche Chimie de la Région Rhône-Alpes pour son soutien financier et la confiance de chaque instant accordée par ses responsables à ce travail, qu'ils en soient remerciés.

Je suis profondément reconnaissant envers Madame Cécile CREN-OLIVE, chargée de recherche au SCA, pour avoir suivi au quotidien mes travaux dès son arrivée au laboratoire. Qu'elle trouve ici toute ma plus grande considération et mon plus grand respect pour la confiance, le grand soutien et sa disponibilité qu'elle m'a accordée. Sa ténacité, son encadrement scientifique, technique et rédactionnel m'ont permis d'avancer dans une ambiance dynamique, sympathique et chaleureuse. J'espère encore bénéficier de ses précieux conseils à l'avenir.

Je suis extrêmement sensible à l'honneur que m'ont fait Monsieur Damiá BARCELO, Professeur à l'institut de recherches chimiques et environnementales de Barcelone, et Monsieur Serge RUDAZ, Maître d'enseignement et de recherche à l'Université de Genève en acceptant de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

J'exprime mes remerciements à Monsieur Jean-Jacques LEBRUN, directeur du SCA-USR059, pour avoir lu si attentivement mon manuscrit et pour sa participation au jury.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur Pierre LANTERI pour m'avoir accordé le privilège de présider le jury de cette thèse.

La réalisation de ce travail n'aurait pas été possible sans la contribution et le soutien de nombreuses personnes du laboratoire.

Je remercie tout particulièrement Mademoiselle Barbara GIROUD pour ses conseils de chromatographe et massiste pour le bon usage d'un appareil aussi robuste soit-il qu'est un Quattro Micro. Je la remercie également pour m'avoir initié au mode MRM « du côté obscur » de la porte. J'espère lui avoir démontré que cette terrible machine peut subir 108 h de séquence non stop. Je ne saurais oublier d'exprimer un « merci » pour m'avoir permis d'injecter des extraits de boue non purifiés. Tu ne le savais pas ? Enfin ce challenge (ou pas) n'aurait pas été si bien réussi sans des concessions de sa part afin de me laisser travailler sur ce « spectro », donc MERCI !

Je tiens à exprimer un grand merci scientifique et amical à l'équipe de masse « ancienne » et « nouvelle génération », merci Guy pour vos « petits-tips » comme l'ajout de tiers-solvant qui ont permis de ne pas perdre courage devant un extrait de boue ignoble, merci Carine et Arnaud de m'avoir formé aux joies de l'entretien d'un GC, merci Lilou d'avoir partagé mon plaisir d'écouter Mika en dépouillant une séquence de 3 jours, merci à Nat' pour toutes tes explications sur le fonctionnement et le principe des différents systèmes de mesure de masses, merci à toi, Fred de m'avoir écouté et aidé face à une décision que je ne regrette pas dorénavant, merci aussi pour la mise à disposition de ton expérience en MALDI pour l'analyse des alkylphénols éthoxylés jusqu'à tard le vendredi soir !

Je remercie vivement toute l'équipe de « jeunes » du RDC pour avoir mis une si bonne ambiance dans ce laboratoire, que Mesdames Emmanuelle VUILLET, Laure WIEST ainsi que Mesdemoiselles Marie HANGOUET, Anne BONHOMME et Monsieur Florent LAFAY en soient remerciés pour leur bonne humeur, leur écoute aussi bien scientifique qu'amical !

Je n'oublierai pas la « vieille garde » assurée de mains de maître par Mesdames Bernadette PAIS, Corine SANGLAR et Messieurs Christian ARGOUD et Bernard JUNEVEYTON, leur expérience en termes techniques et en termes de relations humaines m'ont permis de comprendre beaucoup de choses. Une spéciale attention à ces deux derniers « personnages » que sont M^{onsieur} soufflette, véritable artiste-verrier, et Nanard Bricole-tout pour m'avoir sorti de situation plus qu'improbable.

Je souhaiterais également émettre des remerciements caféinés à mes collègues de « tasses » représentés par Madame Marie-Magdeleine FLAMENT-WATON, Messieurs Guy RAFFIN, d'autant plus pour sa participation à des « tentatives » de purification d'extraits de

boues par GPC, ainsi que Hughes WATON, Robert BAUDOT et Olivier PAÏSSE pour mes débuts dans le monde la chromatographie.

Je ne pourrais oublier, Mademoiselle, Marie-Laure BAYLE, avec qui j'ai partagé professionnellement trois ans de travail. L'expression de l'apaisement social et les après-midi radiophoniques de la « tête au carré » n'ont plus aucun secret pour moi ! Je te souhaite la plus belle des continuations dans ta vie professionnelle et privée. Souviens-toi de ce que je disais quand tu seras en conférence préliminaire du plus grand congrès intergalactique de masse et qu'on présentera ta carrière !

A chaque projet correspond un moniteur, et pour la cause je remercie Monsieur Ludovic FINE, partenaire de bad, de rando, de « bêtises », de séances gastronomiques mais aussi scientifiques. L'avenir d'un jeune homme tel que celui-ci est grande, merci pour tes explications, tes conseils, tes relectures scientifiques mais aussi ta chaleur humaine et ton amitié !

D'ailleurs entre nous soit dit, je remercie conjointement la gardienne du refuge de Valmasque de nous avoir accueillie après 30 ... bonnes minutes de marche ... la sandale est à ramener au précédent Monsieur cité.

Je continuerai par remercier mes partenaires scientifiques et sportifs qui m'ont suivis pendant ses trois ans, Messieurs Olivier BOYRON, Nicolas LAVENANT (jeunes pères actifs), Patrick GOETINCK, Eric BONJOUR, Pascal ROUQUET et Sabri DEROUICHE, indissociables tels des processeurs double cœur, Stéphane HUPONT et Florent ARNAUD-GODET.

Dans les étages du laboratoire, je tiens à remercier Xavier, Gaëlle, Danny, Fabienne, Cathy, Hervé, Vanessa, Magali et en terminant par le meilleur des meilleurs Patrick J., que cet étage garde sa bonne ambiance et son savoir-vivre !

L'analyse des métaux des boues n'aurait pas été possible sans l'aide de Frédérique et Lionel, merci.

Enfin, par ordre d'apparition je voudrais remercier Marion, Delphine, Linda, grande-Laure, Caroline(s), Sarah, Nathalie, Florent, Virginie, Dominique, Fabien, Sophie qui ont partagés leur statut de « stagiaire-du-SCA » avec moi.

Une énorme pensée pour mes parents et ma famille sans qui mon parcours n'aurait pas été celui-là. Merci de leur soutien, des prières de ma Manou...

Enfin, un immense merci à ma Christelle pour ses encouragements et sa patience de tous les instants, pour tout ce que nous avons partagé, ce que nous partageons et ce que nous partagerons.

SOMMAIRE

Liste des figures	15
Liste des tableaux	21
Liste des équations	24
Introduction générale.....	25

CHAPITRE I

Partie 1 : Réglementation Européenne du système REACH **(Registration,Evaluation, Authorisation of CHemicals)**

1. Introduction – Contexte antérieur.....	33
2. Historique	33
3. Agence Européenne des produits chimiques (ECHA).....	34
4. Objectifs, mise en application et impacts	34
5. Aspects réglementaires	35
5.1. Enregistrement.....	36
5.2. Evaluation.....	37
5.3. Autorisation	38
6. Informations - Utilisateurs - Restrictions.....	39
7. Conclusion.....	40

Partie 2 : Polluants Organiques Persistants (POPs), Perturbateurs **Endocriniens (PEs) et substances émergentes présentes dans les matrices** **environnementales**

1. Introduction.....	43
2. Polluants Organiques Persistants (POPs) et Perturbateurs Endocriniens (PEs).....	43

2.1.	POPs.....	43
2.1.1.	Définition	43
2.1.2	Impacts sur l'environnement des POPs	44
2.1.3.	POPs choisis – Les pesticides.....	45
2.1.3.1.	Organophosphorés (OPPs)	
	Utilisations – Structures - Caractéristiques	45
2.1.3.2.	Organochlorés (OCPs)	
	Utilisations – Structures - Caractéristiques	46
2.1.3.3.	Carbamates et thiocarbamates	
	Utilisations – Structures - Caractéristiques	47
2.1.3.4	Fongicides	
	Utilisations – Structures - Caractéristiques	48
2.2.	Perturbateurs Endocriniens (PEs)	49
2.2.1	Définition	49
2.2.2.	Hormones naturelles et/ou de synthèse.....	50
2.2.3.	Substances anthropiques	50
2.2.4.	Impacts sur l'environnement [24].....	51
2.2.5	PEs domestiques et industriels choisis.....	51
2.2.5.1.	Alkylphénols	51
2.2.5.2.	Phtalates et Bisphénol A	55
3.	Devenir dans l'environnement	56
3.1.	STations d'EPuration (STEP)	57
3.1.1.	Traitements de l'eau dans une station d'épuration.....	57
3.1.1.1.	Le traitement primaire [50].....	58
3.1.1.2.	Le traitement secondaire [50].....	58
3.1.1.3.	Le traitement tertiaire [50].....	60
3.2.	Le devenir des polluants après traitements.....	61
3.2.1.	Devenir environnementale des pesticides	62

3.2.1.1.	OPPs.....	62
3.2.1.2.	OCPs	62
3.2.1.3.	Carbamates et thiocarbamates	63
3.2.1.4.	Fongicides.....	63
3.2.2.	Devenir environnemental des PEs domestiques et industriels	64
3.2.2.1.	Alkylphénols	64
3.2.2.2.	Phtalates et bisphénol A.....	66
4.	Occurrence dans les matrices environnementales.....	67
4.1.	Matrices aqueuses	67
4.2.	Matrices solides.....	68
4.3.	Concentrations mesurées en pesticides	69
4.3.1.	OPPs.....	69
4.3.2.	OCPs.....	70
4.3.3.	Carbamates et thiocarbamates.....	71
4.3.4.	Fongicides	71
4.4.	Concentrations mesurées en PEs	71
4.4.1.	Alkylphénols	71
4.4.2.	Phtalates et Bisphénol A.....	72

Partie 3 : Extraction et analyse des substances recherchées
dans les matrices complexes

1.	Techniques d'extractions	75
1.1.	Extractions à partir de matrices aqueuses	75
1.1.1.	Microextraction en phase solide (SPME)	75
1.1.2.	Extraction par adsorption sur barreau aimanté (SBSE)	76
1.1.3.	Extraction sur phase solide (SPE)	77
1.2.	Extractions à partir de matrices solides	79
1.2.1.	Soxhlet	79

1.2.2. Micro-ondes.....	79
1.2.3. Extraction sous pression et à chaud.....	80
2. Techniques de séparation	82
2.1. Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG).....	82
2.2. Chromatographie en Phase Liquide (CPL)	82
3. Systèmes de détection	83
3.1. Spectrométrie de masse.....	83
3.1.1. Sources d'ionisation	83
3.1.2. Les analyseurs	86
3.2. Spectrométrie de masse en tandem	89
Conclusion – Objectif final	91
Références bibliographiques du chapitre I.....	92

CHAPITRE II

Partie 1 : Mise au point de la méthode d'analyse des 33 substances

1. Introduction.....	105
2. Disponibilité, choix et purification des références étalons	106
2.1. Choix des étalons.....	106
2.2. Cas des alkylphénols éthoxylés.....	106
2.2.1. Chromatographie semi-préparative	106
2.2.2. Chromatographie flash	108
2.2.3. Conclusions.....	108
3. Choix des techniques analytiques en vue de la mise au point de la méthode d'analyse des 33 substances	108

3.1. Analyse multi-résidus par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	109
3.1.1. Appareillage	109
3.1.2. Sensibilité suivant les familles de composés	109
3.1.3. Optimisation de la séparation de 11 composés	112
3.1.4. Problèmes rencontrés lors de l'analyse par CPG-SM	
Nécessité d'une analyse complémentaire en CPL-SM/SM	113
3.1.4.1 Dégradation du propoxur (carbamate).....	113
3.1.4.2. Comportement chromatographique du 2-imidazolidinethione par CPG	116
3.1.4.3. Effet du solvant	117
3.1.4.4. Quantifications délicates des nonylphénols en CPG-SM	118
3.1.4.5. Sensibilités insuffisantes	119
3.1.5. Conclusion de l'étude des composés pour l'analyse par CPG-SM.....	119
3.2. Analyse multi-résidus par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CPL-SM/SM).....	120
3.2.1. Appareillage	120
3.2.2. Optimisation de la séparation	120
3.2.2.1. Choix de la phase stationnaire et de la phase mobile.....	120
3.2.2.2. Etude de la température.....	122
3.2.2.3. Optimisation de la détection en spectrométrie de masse.....	124
3.2.2.4. Optimisation de la présence d'acétate d'ammonium.....	128
3.2.2.5. Optimisation de la concentration en acétate d'ammonium.....	129
3.2.2.6. Choix du solvant et du volume d'injection.....	130
3.2.3. Sensibilité suivant les familles de composés	132

Partie 2 : Préparation d'échantillon et optimisation de l'extraction
des 33 substances à partir des matrices aqueuses

1. Introduction.....	137
----------------------	-----

2.	Collecte de l'échantillon	137
3.	Filtration et conditionnement de la matrice.....	137
3.1.	Evaluation de l'étape de filtration	137
3.2.	Conditionnement de l'échantillon	138
4.	Optimisation de la SPE.....	140
4.1.	Extraction des analytes à partir de la matrice	140
4.1.1.	Sélection de la phase solide	140
4.1.2.	Vitesse et volume d'échantillon chargés en SPE	141
4.1.2.1.	Volume d'échantillon en SPE	141
4.1.2.2.	Vitesse de charge en SPE.....	142
4.1.3.	Choix des solvants d'élution	143
4.1.4.	Choix du pH de l'échantillon et impact sur la SPE	144
4.1.5.	Protocole SPE optimisé.....	146
4.2.	Purification de l'extrait obtenu.....	146
5.	Evaluation du tiers solvant.....	147

**Partie 3 : Choix de la procédure de quantification et application de la méthode
à des eaux environnementales**

1.	Introduction.....	151
2.	Quantification en analyse environnementale	151
2.1.	Evaluation de l'effet de matrice.....	151
2.2.	Méthodes d'étalonnage	153
2.2.1.	Etalonnage externe	153
2.2.2.	Etalonnage interne	153
2.2.3.	Ajouts dosés.....	154
2.3.	Méthode des ajouts dosés appliquée au protocole	154

3.	Validation de la méthode	155
3.1.	Linéarité de la méthode	155
3.2.	Validation des limites de détection et de quantification de la méthode.....	156
4.	Application de la méthode sur des échantillons réels.....	156
4.1.	Résultats des effluents de STEP	157
4.2.	Résultats des eaux du robinet et industrielles.....	159
4.3.	Résultats des eaux souterraines.....	159
4.4.	Résultats des eaux de surface et eau de pluie	160
5.	Essais sur la réduction des limites.....	161
	Conclusion – Objectifs atteints	164
	<i>Références bibliographiques du chapitre II.....</i>	166

CHAPITRE III

Partie 1 : Réglementation et caractérisation des matrices solides

1.	Introduction.....	175
2.	Les matrices solides – Aspects réglementaires	175
2.1.	Boues de STEP.....	176
2.1.1.	Origine des boues	176
2.1.2.	Composition des boues	176
2.2.	Sols – Matières en suspension - Sédiments	177
2.3.	Retombées atmosphériques.....	177
3.	Caractéristiques des échantillons étudiés	177
3.1.	Caractéristiques physico-chimiques.....	177
3.2.	Analyse élémentaire	177

3.2.1. Microanalyse élémentaire.....	178
3.2.2 Analyse des métaux par PCI-SM.....	178
3.2.2.1. Protocole de minéralisation et d'analyse	179
3.2.2.2. Résultats sur les boues de STEP et comparaison avec les valeurs limites réglementaires	179
3.3. Analyse des composés volatils.....	180
4. Conclusion.....	180

Partie 2 : Optimisation de l'extraction des substances à partir des matrices solides et étude de la purification de l'extrait obtenu

1. Introduction – Objectifs.....	183
2. Prétraitement de la matrice solide.....	183
2.1. Séchage.....	183
2.2. Homogénéité.....	184
2.2.1. Broyage.....	184
2.2.2. Tamisage.....	184
2.2.3. Utilisation de la Terre de diatomées.....	184
3. Protocole d'étude de l'extraction.....	185
3.1. Procédure de dopage.....	185
3.1.1. Dopage par solution organique.....	185
3.1.2. Dopage par dépôt.....	185
3.1.3. Comparaison et choix de la procédure de dopage.....	186
3.2. Etude statistiques de l'extraction – Plan d'expériences.....	187
3.2.1. Choix des paramètres d'extraction	187
3.2.1.1. Solvant.....	187
3.2.1.2. Température.....	187
3.2.1.2.1. Dégradations thermiques.....	187

3.2.1.2.2.	Comportement de la matrice à haute température.....	188
3.2.1.3.	Pression.....	189
3.2.1.4.	Durée et nombre de cycle d'extraction	190
3.2.1.4.1.	Durée – Temps statique	190
3.2.1.4.2.	Nombre de cycles d'extraction.....	190
3.3	Mise en place du plan d'expériences.....	190
3.4	Résultats	192
3.4.1.	Résultats bruts	192
3.4.2.	Exploitation des résultats statistiques	193
3.5.	Méthode d'extraction optimisée	195
4.	Purification de l'extrait.....	196
4.1.	Chromatographie d'Exclusion Stérique (CES)	196
4.2.	Chromatographie flash	197
4.3.	Extraction liquide-liquide.....	198
4.4.	Protocole SPE	199
4.4.1.	D'après l'étude bibliographique – polarité des phases inversées.....	199
4.4.2.	D'après le protocole de purification des matrices aqueuses – phase normale	199
5.	Etude du protocole d'évaporation de l'extrait	200

Partie 3 : Application de la méthode à l'analyse de 22 substances à partir des matrices solides - Résultats

1.	Méthode d'analyse	211
1.1.	Effet de matrice	211
1.2.	Linéarité - Limites de détection et de quantification	212
2.	Echantillons évalués.....	213
2.1.1.	Boues de STEP	213
2.1.2.	Matières en suspension.....	213

2.1.3. Retombées atmosphériques.....	213
2.1.4. Dépôts de toiture	213
3. Résultats	214
3.1. Boues de STEP.....	214
3.2. Matières en suspension.....	215
3.3. Retombées atmosphériques.....	215
3.3. Dépôts de toiture	215
Conclusions – Objectifs atteints.....	215
<i>Références bibliographiques du chapitre III</i>	217
Conclusion générale.....	221
Annexes	227
Annexe I : Classification des substances chimiques en Europe – Définitions des actes juridiques communautaires.....	229
Annexe II : Réglementation, classification, emballage, étiquetage des substances et préparations dangereuses.....	231
Annexe III : Extrait du règlement (CE) N° 1907/2006 du Parlement Européen et du Conseil du 18 décembre 2006	235
Annexe IV : Structures moléculaires des substances choisies	363
Annexe V : Actes contraignants mentionnant les substances étudiées.....	367
Annexe VI : Récapitulatif des teneurs retrouvées dans l'environnement.....	377

Annexe VII : Chromatogrammes d'une solution de propoxur solubilisé dans le THF et l'acétate d'éthyle à différentes températures d'injecteur	383
Annexe VIII : Conditions expérimentales d'analyse RMN et spectres obtenus	387
Annexe IX : Calcul de la résolution chromatographique en CPL en fonction de la température	393
Annexe X : Caractéristiques des solvants employés	395
Annexe XI : Etude statistique de la régression linéaire sur les extraits aqueux	397
Annexe XII : Résultats obtenus sur des échantillons réels	399
Annexe XIII : Caractéristiques physico-chimiques des molécules recherchées lors de l'optimisation du protocole d'analyse des matrices solides	401
Annexe XIV : Taux de récupération calculés à partir du plan d'expériences de l'extraction des boues à partir d'une PLE et coefficients du second ordre du modèle synergique	403
Annexe XV : Graphes de l'étude de l'évaporation et de l'effet de la concentration des analytes à partir d'extraits blancs et d'extraits de boues dopés	407
Annexe XVI : Etude statistique de la regression linéaire sur les extraits de boues.....	413
Annexe XVII : Résultats obtenus sur les matrices solides	415
Publications et communications	417

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures du chapitre I

Figure 1-1: Schéma général de la procédure de REACH [2].....	35
Figure 1-2 : Structure chimique des organophosphorés	46
Figure 1-3 : Structure chimique générale des carbamates (1), des thiocarbamates (2) et des dithiocarbamates (3).....	47
Figure 1-4 : Propoxur (1), prosulfocarbe (2) et 2-midazolidinethione (3).....	48
Figure 1-5 : Structures de base des triazoles (1), des morpholines (2), des pyridazinones (3).....	49
Figure 1-6 : Hormones naturelles, progestérone (1) et testostérone (2).....	50
Figure 1-7 : Substances anthropiques, Bisphénol A (1) et Octylphénol (2)	51
Figure 1-8 : Voies de synthèse industrielle des APs et APnEOs [34].....	52
Figure 1-9 : Exemples d'AlkylPhénols (APs) et AlkylPhénols EthOxylés (APnEO)	53
Figure 1-10 : Formule moléculaire des DEHP (1), DBP (2) et BPA (3)	55
Figure 1-11 : Les différents traitements réalisés dans une station d'épuration [51].....	57
Figure 1-12 : Schéma du cycle de l'eau [53].....	61
Figure 1-13 : 1,2,4 triazole, noyau morpholine.....	64
Figure 1-14 : Biodégradation des APnEOs lors du traitement aérobie/anaérobie en stations d'épuration [60-62].....	65
Figure 1-15 : Métabolites halogénés.....	66
Figure 1-16 : Voie de dégradation bactérienne des phtalates [47].....	67
Figure 1-17 : Cycle de mobilité des polluants dans l'environnement via les stations d'épuration.....	69
Figure 1-18 : Schéma d'un extracteur sous pression et à chaud (Source : Dionex S.A.)	81

Figure 1-19 : Structure d'une source à ionisation à Impact Electronique (IE) [119].....	84
Figure 1-20 : Structure d'une source à Ionisation Chimique (IC) [119].....	85
Figure 1-21 : Structure d'une source ElectroSpray (ES) [119]	86
Figure 1-22 : Structure d'un analyseur quadripolaire [120]	87
Figure 1-23 : Schéma de la structure d'une trappe et de la trajectoire des ions [120].....	87
Figure 1-24 : Structure d'un analyseur à temps de vol [120].....	88
Figure 1-25 : Structure d'un analyseur en mode réflectron [120].....	88
Figure 1-26 : Structure d'un triple quadripôle [121]	88

Liste des figures du chapitre II

Figure 2-1 ; Arbre de décision pour le développement de méthode d'analyse environnementale [1].....	105
Figure 2-2 : Chromatogramme obtenu en CPL préparative sur un mélange d'OPnEOs et NPNnEOs	107
Figure 2-3 : Gradient de température optimisé et choisi pour l'étude.....	112
Figure 2-4 : Chromatogramme type d'un mélange des 11 composés recherchés (pesticides OCPs (8), phtalates (2) et le bisphénol A).....	113
Figure 2-5 : Dégradation thermique du propoxur par réarrangement de MacLafferty avec formation de 2-isopropoxyphénol [19].....	114
Figure 2-6 : Chromatogrammes des étalons du propoxur et du 2-isopropoxyphénol solubilisés dans différents solvants.....	115
Figure 2-7 : Chromatogramme d'un étalon de propoxur solubilisé dans le méthanol suivant la température de l'injecteur	116
Figure 2-8 : Chromatogramme d'un étalon de 2-imidazolidinethione obtenu par CPG sur HP-5MS.....	117
Figure 2-9 : Chromatogrammes d'une solution étalon de HPTE solubilisé dans 5 solvants ..	118
Figure 2-10 Chromatogramme d'un mélange des alkylphénols analysés	119
Figure 2-11 : Gradient de solvant utilisé en CPL.....	121
Figure 2-12 : Chromatogramme d'une solution étalon des 22 composés à une température de four de 30°C	123
Figure 2-13 : Chromatogramme d'une solution étalon des 22 composés à une température de four de 60°C	123
Figure 2-14 : Spectres de masse obtenus par scan dans différentes conditions (ajouts + polarité) lors de l'optimisation d'une solution de méthamidophos à 1 ppm, AF Acide Formique, AcNH ₄ ⁺ acétate d'ammonium.....	125

Figure 2-15 : Spectres de masse obtenus par scan dans différentes conditions (variations tension de cône + ajouts) lors de l'optimisation d'une solution de propoxur à 1 ppm, AF Acide Formique, AcNH ₄ ⁺ acétate d'ammonium.....	125
Figure 2-16 : Spectres de masse obtenus en mode MRM pour la recherche des ions fils, exemple du méthamidophos et du propoxur, AcNH ₄ ⁺ acétate d'ammonium.....	126
Figure 2-17 : chromatogrammes du 2-imidazolidinethione et du méthamidophos injectés dans l'acétone et dans l'acétonitrile séparément.....	130
Figure 2-18 : Chromatogrammes du 2-imidazolidinethione (1) et du méthamidophos (2) injectés dans l'isopropanol et dans le tétrahydrofurane séparément.....	131
Figure 2-19 : Chromatogramme type obtenu en CPL-SM/SM pour les 22 composés en solution dans le THF.....	132
Figure 2-20 : Filtre Millipore YT30 142 HW.....	137
Figure 2-21 : Taux de récupération des APs et APEOs en fonction de la phase solide	141
Figure 2-22 : Rendements SPE obtenus en fonction du pH de l'échantillon	145
Figure 2-23 : Effet de matrice évalué sur un effluent de STEP	152
Figure 2-24 : Courbe d'étalonnage type obtenue lors d'ajouts dosés.....	154
Figure 2-25 : Résultats obtenus pour les effluents et l'eau potable sur les composés quantifiés dans ces matrices.....	158
Figure 2-26 : Résultats obtenus pour les eaux souterraines, de surface, eau de pluie et eau traitée sur les composés quantifiés dans ces matrices	160
Figure 2-27 : Schéma synoptique du protocole analytique mis en place pour les matrices aqueuses.....	165

Liste des figures du chapitre III

Figure 3-1 : Chromatogramme d'un échantillon de boue fraîche analysée par HS-CPG/SM 180	
Figure 3-2 : Taux de récupérations obtenus pour un dopage par solution organique (blanc) ou par dépôt d'un spot d'une solution étalon (gris).....	186
Figure 3-3 : Spectre IR du résidu obtenus après PLE d'une boue à une pression supérieure ou égale à 140 bars et une température supérieure ou égale à 100°C	188
Figure 3-4 : Spectre IR obtenu et comparé avec ceux d'une base de données spectrale pour la recherche et l'identification du résidu	189
Figure 3-5 : Protocole expérimental du traitement de l'échantillon lors de l'étude des paramètres de l'extraction par PLE.....	192
Figure 3-6 : Taux de récupération minimum (gris) et maximum (noir) obtenus lors de l'extraction suivant le plan d'expérience mis en œuvre	193
Figure 3-7 : Coefficients du premier ordre b_1 (Pression) et b_2 (Température) calculés pour chacun des composés	194
Figure 3-8 : Coefficients du premier ordre b_3 (Durée statique) et b_4 (Nombre de cycles) calculés pour chacun des composés	194
Figure 3-9 : Chromatogramme CES-UV (254 nm) d'une injection de toluène	196
Figure 3-10 : Chromatogramme CES-UV (254 et 278 nm) d'un mélange étalon à 5 ppm (bleu turquoise et vert) et d'une boue non dopée (bleu foncé)	197
Figure 3-11 : Rendements de l'étape de purification d'un extrait de boue.....	200
Figure 3-12 : Schéma de l'expérience avec extrait blanc dopé en quantité équivalente avant évaporation.....	201
Figure 3-13 : Rapports des aires obtenues lors de l'évaporation d'un extrait blanc dopé identiquement pour une masse finale de 1,5 g et 1 g, droite en pointillés représente le seuil théorique situé à 1,70	201

Figure 3-14 : Schéma de l'expérience avec extrait blanc dopé en quantité différente avant évaporation.....	203
Figure 3-15 : Rapports des aires obtenues lors de l'évaporation d'un extrait blanc dopé en fonction de la masse finale recherchée, résultats pour une masse finale de 1,5 g et 1 g, droite en pointillés représente le seuil théorique situé à 1,56.....	203
Figure 3-16 : Schéma de l'expérience avec extrait blanc évaporé puis dopé en quantité différente	203
Figure 3-17 : Rapports des aires obtenues lors de l'évaporation d'un extrait blanc dopé en fonction de la masse finale recherchées, résultats pour une masse finale de 1,5 g et 1 g, droite en pointillés représente le seuil théorique situé à 1,50.....	204
Figure 3-18 : Schéma de l'expérience avec un extrait de boue dopé en quantité identique avant évaporation.....	204
Figure 3-19 : Rapports des aires obtenues lors de l'évaporation d'un extrait de boue dopé identiquement pour une masse finale de 1,5 g et 1 g, droite en pointillés représente le seuil théorique situé à 1,45.....	205
Figure 3-20 : Schéma de l'expérience réalisée avec extrait de boue dopé en quantité différente avant évaporation	205
Figure 3-21 : Rapports des aires obtenues lors de l'évaporation d'un extrait blanc dopé en fonction de la masse finale recherchée, résultats pour une masse finale de 1,5 g et 1 g, droite en pointillés représente le seuil théorique situé à 1,40.....	206
Figure 3-22 : Aires mesurées pour chaque analytes en fonction de leur concentration dans 0,5 (noir), 1 (blanc) et 1,5 g (gris) d'extrait	207
Figure 3-23 : Effet de matrice évalué sur un extrait de boue de STEP.....	211
Figure 3-24 : Résultats en ppb (mg.kg^{-1}) sur les échantillons solides analysés par la méthode mise au point en CPL-SM/SM.....	214
Figure 3-25 : Schéma synoptique du protocole analytique mis en place pour les matrices solides	216

Liste des tableaux du chapitre I

Tableau 1-1 : Caractéristiques physico-chimiques des OPPs [6, 8].....	46
Tableau 1-2 : Caractéristiques physico-chimiques des OCPs, (a) mesuré à 25°C, NE Non Evaluée [16, 17].....	47
Tableau 1-3 : Caractéristiques physico-chimiques des carbamates et thiocarbamates, (a) 30°C, [6, 19]	48
Tableau 1-4 : Caractéristiques physico-chimiques des fongicides [6]	49
Tableau 1-5 : Caractéristiques physico-chimiques des APs et APnEOs, NE (Non Evalué) [37-39].....	54
Tableau 1-6 : Caractéristiques physico-chimiques [24, 46].....	56
Tableau 1-7 : Mesures caractéristiques de l'efficacité du traitement secondaire [50].....	60
Tableau 1-8 : Résumé des travaux comportant une étape de SPME sur des eaux environnementales	76
Tableau 1-9 Résumé des travaux comportant une étape de SBSE sur des eaux environnementales	77
Tableau 1-10 : Résumé des travaux comportant une étape de SPE sur des eaux environnementales, NI Non Indiqué.....	78
Tableau 1-11 : Résumé des travaux comportant une étape d'extraction par soxhlet	79
Tableau 1-12 : Résumé des travaux comportant une extraction par micro-ondes, NI, Non Indiqué	80
Tableau 1-13 : Résumé des travaux comportant une étape de PLE.....	81

Liste des tableaux du chapitre II

Tableau 2-1 : Puretés des fractions collectées après chromatographie préparative analysées par CPG-SM.....	107
Tableau 2-2 : Limites de Détection et de Quantification (LD et LQ) des composés sélectionnées obtenues en CPG-SM à partir des effluents de STEP	111
Tableau 2-3 : Valeurs de la résolution en fonction de la température du four	124
Tableau 2-4 : Composés détectés en CPL-SM/SM (a) diastéréoisomères	127
Tableau 2-5 : Sensibilité obtenue pour chacun des composés en fonction de la composition de la phase mobile en acétate d'ammonium.....	128
Tableau 2-6 : Pourcentage de sensibilité obtenue pour chacun des composés en fonction de la concentration d'acétate d'ammonium en phase aqueuse.....	129
Tableau 2-7 : Limites de Détection et de Quantification (LD et LQ) des composés obtenus en CPL-SM/SM à partir des effluents de STEP	133
Tableau 2-8 : Etude de la stabilité des composés dans un effluent de STEP à pH=3,5 conservé au noir à 4°C durant 10 jours.....	139
Tableau 2-9 : Taux de récupération obtenus pour deux volumes de charge, 300 et 500 mL d'un même effluent de STEP	142
Tableau 2-10 : Taux de récupération pour deux vitesses de charge de l'échantillon sur une cartouche de 500 mg Strata-C-18 en SPE.....	143
Tableau 2-11 : Pourcentages des ratios des aires obtenus avec l'acétone, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et l'acétonitrile avec comme référence une élution au méthanol.....	144
Tableau 2-12 : Pressions de vapeur saturante pour les composés analysés, (a) [47] et (b) [48], pertes évaluées lors de l'évaporation d'une solution étalon (isopropanol)	147
Tableau 2-13 : Pressions de vapeur saturante pour les tiers solvants évalués à 20°C	148

Tableau 2- 14 : Evaluation des pertes lors des étapes d'évaporation avec glycérol.....	148
Tableau 2- 15 : Seuils limites réglementaires des teneurs en pesticides pour des eaux destinées à la consommation	157
Tableau 2-16 : Classe de qualité environnementale réglementaire concernant les pesticides	157
Tableau 2-17 : Taux de récupération évalués pour un volume de 500 mL d'eau UP dopée à 500 ng.L ⁻¹	162
Tableau 2-18 : Limites de détection et de quantification pour un protocole de concentration de 2500 fois.....	163

Liste des tableaux du chapitre III

Tableau 3-1 : Résultats de la microanalyse élémentaire des échantillons obtenus.....	178
Tableau 3-2 : Concentrations d'éléments métalliques mesurées par PCI-SM sur un échantillon de boue lyophilisée (ND, Non Déterminé ; NA, Non Applicable).....	179
Tableau 3-3 : Domaine expérimental : Valeurs choisies pour les quatre paramètres étudiés pour l'extraction des analytes à partir des boues	191
Tableau 3-4 : Plan d'expériences : Matrice factorielle complète utilisé lors de l'optimisation de l'extraction des composés recherchés	191
Tableau 3-5 : Paramètres optimum pour l'extraction des 22 composés sélectionnés par PLE	195
Tableau 3-6 : Etude de l'effet de l'évaporation sur un extrait blanc dopé à une concentration identique – coefficient de détermination de la régression linéaire	201
Tableau 3-7 : Limites de détection et de quantification estimées et validée des 22 composés dans les boues de STEP	212

Liste des équations du chapitre II

Équation 2-1 : Calcul d'estimation théorique des limites de détection et de quantification [14]	110
Équation 2-2 : Equation de Van't Hoff [23]	122
Équation 2-3 : Equation de la résolution entre deux pics chromatographiques [23, 25]	122
Équation 2-4 : Equation du calcul de l'effet de matrice [49]	152
Équation 2-5 : Equations utilisées pour la validation des limites de détection et de quantification	156

Liste des équations du chapitre III

Équation 3-1 : Calcul des taux de récupération en fonction de la masse de boue solide et de la masse d'extrait organique en phase solvant obtenues	192
Équation 3-2 : Equation du calcul de l'effet de matrice [34]	211
Équation 3-3 : Estimation des limites de détection (LD) et de quantification (LQ)	212

Introduction générale

Introduction

Face au grand nombre de substances chimiques produites et utilisées dans le monde, et plus exactement en Europe, la communauté européenne s'est inquiétée de la protection de la santé humaine et de l'environnement vis-à-vis de l'utilisation et du devenir de celles-ci. Dans ce contexte, la Commission Européenne a instauré un système dénommé REACH (Registration, Evaluation, and Autorisation of Chemicals) permettant l'identification et l'élimination progressive des produits chimiques les plus dangereux à compter de 2008.

Parmi les 30 000 substances listées par le règlement n° 1907/2006, relatif à REACH, la plupart sont à la fois peu connues et plus ou moins répandues dans l'environnement. Il convient donc d'étudier et de caractériser leur toxicité et leur influence sur la santé humaine et le développement d'organismes présents dans les écosystèmes.

La mise en place de ce système et des autres systèmes réglementaires européens (Directive Cadre Eau, projet de Directive Sols) nécessite donc de développer des méthodes d'analyse robustes, fiables et reproductibles de ces molécules à l'état de traces et/ou ultra-traces dans des matrices environnementales, atteignant des seuils de sensibilité de l'ordre du $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ et du $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ compatibles avec les normes engagées.

Ce travail, effectué dans le cadre d'un programme de la région Rhône-Alpes, porte sur 33 substances prioritaires sélectionnées à partir de la liste REACH et susceptibles d'être présentes dans les effluents et les boues de station d'épuration de la région. A partir de l'étude des contaminants représentant les activités industrielles et agricoles Rhône-Alpines, nous avons décidé d'analyser 8 pesticides organochlorés (famille du DDT, méthoxychlore et son métabolite HPTE), 2 organophosphorés (méthamidophos et diméthoate) et 3 carbamates (propoxur, prosulfocarbe et le 2-imidazolidinethione, résidu du mancozèbe), 6 fongicides (fluquinconazole, bromuconazole, diméthomorphe, tétraconazole, tébuconazole, hexaconazole), 1 acaricide (pyridabène), 2 phtalates (diéthylhexylphtalate et le dibutylphtalate), le bisphénol A (industrie du plastique) et 10 alkylphénols (nonylphénols, octylphénols, nonylphénols éthoxylés et octylphénols éthoxylés). Ce projet vise à développer des méthodologies analytiques couvrant la recherche et l'identification de ces substances aux propriétés physico-chimiques bien distinctes. Les techniques de concentration sur phase solide (SPE) et les couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse seront tout particulièrement exploités dans le cadre de ces travaux de recherche.

Le protocole élaboré, comprenant la préparation de l'échantillon ainsi que l'analyse multirésidus s'est révélé être un véritable défi analytique. En effet très peu de méthodes d'analyse multirésidus simultanée ne s'intéressent à autant de familles de composés présentant des caractéristiques physico-chimiques si différentes.

La méthode de « clean-up » et de préconcentration des substances est basée sur une extraction sur phase solide (SPE) avec une phase C-18 suivie d'une purification sur silice pour les matrices aqueuses. L'extraction des boues s'est révélée beaucoup plus délicate. Nous avons développé une

Introduction

stratégie s'appuyant sur l'utilisation d'un extracteur automatique par solvant sous pression et à chaud, nécessitant une optimisation grâce à un plan d'expérience de Plakett-Burman.

Finalement, les substances analysées par deux techniques chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse nous permettent d'atteindre des limites de détection comprises entre 7,2 ppt (ng.L^{-1}) et 1,27 ppb ($\mu\text{g.L}^{-1}$) dans les matrices aqueuses et entre 5 ppb ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) et 1,7 ppm ($\mu\text{g.g}^{-1}$) dans les matrices solides permettant le suivi de ces substances à l'état d'ultra-traces et de traces.

Dans ce mémoire, nous présenterons dans une première partie quelques rappels bibliographiques sur la réglementation liée à REACH ainsi que les substances sélectionnées pour l'étude et leur devenir dans les matrices environnementales. Nous ferons un focus sur les matrices de rejets des Stations d'Épuration (STEP) sur lesquelles nous avons mis au point la totalité du protocole, c'est à dire les effluents de STEP pour les matrices aqueuses et les boues de STEP pour les matrices solides. Nous présenterons ensuite les méthodes analytiques les plus utilisées actuellement dans les laboratoires d'analyses environnementales.

Dans la deuxième partie de ce travail nous nous intéresserons à l'optimisation de l'extraction et de la purification des analytes à partir des matrices aqueuses ainsi que du choix de la technique analytique la mieux adaptée à chacune des substances sélectionnées. Les résultats présentés permettent de mettre en évidence ces judicieux compromis. Ils ont ainsi permis la détection simultanée des 33 substances par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem et par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse tout en atteignant des limites de détection adaptées aux seuils environnementaux. La procédure de quantification et une préparation à la validation ont été étudiées et la stratégie analytique appliquée à différents types d'échantillons aqueux. Les résultats obtenus permettent d'observer la présence et la persistance de certains composés tels que les pesticides organochlorés et les perturbateurs endocriniens industriels.

La troisième partie portera sur les enjeux analytiques engagés comprenant l'optimisation de l'extraction et de la purification de l'échantillon à partir de matrices environnementales solides. L'extraction par solvant sous pression et à chaud a été évaluée par l'étude statistique des effets de la variation des différents paramètres, et l'étape de l'évaporation de l'extrait a permis de sélectionner une masse limite à ne pas dépasser. Tous ces résultats ainsi que la préparation à la validation réalisée sur 22 composés font de la méthode d'analyse mise au point, un protocole analytique performant appliqué à des échantillons réels aussi variés que des boues de STEP, des retombées atmosphériques, des dépôts de toiture et des sédiments de rivière. La présence ou l'absence d'un certain nombre de composés a été révélée.

Chapitre I

I.1 Réglementation Européenne du système REACH (Registration, Evaluation, Autorisation of CHemicals)

1. Introduction – Contexte antérieur

Depuis le milieu du XX^{ième} siècle, la production mondiale de produits chimiques a explosé, passant d'un million de tonnes en 1930 à 400 millions aujourd'hui. De plus, le nombre de substances chimiques enregistrées au CAS (Chemical Abstract Service) augmente sans cesse, dépassant les 38 millions en 2008 [1]. Néanmoins, il existe peu de données sur l'impact toxicologique de toutes les molécules produites et/ou répertoriées. En effet seulement 3 000 substances sur les 100 000 commercialisées en Europe ont été étudiées, et les informations disponibles ne sont pas suffisantes pour estimer un risque associé à leur utilisation.

Dans ce contexte, la Communauté Européenne s'est inquiétée de la protection de la santé humaine et de l'environnement et a évalué à près de 50 milliards d'euros, sur 30 ans, le gain en terme de réduction des dépenses de santé liées aux allergies, cancers, maladies de la peau ou respiratoires. Il est en effet difficile de connaître aujourd'hui les effets sur la santé et l'environnement des molécules chimiques présentes pourtant dans un grand nombre de produits de consommation courante.

2. Historique

Le système précédant relatif aux substances chimiques, regroupant plus de quarante actes législatifs antérieurs (définitions, cf Annexe I), s'est souvent révélé incapable d'identifier les risques présentés par de nombreuses molécules ou préparations chimiques. La législation antérieure faisait une distinction entre les « substances existantes », à savoir toutes les substances chimiques déclarées sur le marché avant 1981 et numérotée selon le EINECS et les « nouvelles substances », à savoir celles qui ont été mises sur le marché depuis cette date et classées selon le ELINCS (définitions données en annexe I). Il s'agit essentiellement de celles dont la production a débuté après l'application de la directive européenne 67/548/CEE, datée du 27 juin 1967, qui contraint industriels et importateurs à fournir des données toxicologiques sur les produits qu'ils commercialisent. La réglementation sur la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances et préparations dangereuses est donnée en annexe II. Par ailleurs, la charge de la preuve de la sécurité des substances chimiques commercialisées incombait seulement aux autorités publiques [2, 3].

En avril 1998, suite à un conseil informel des ministres de l'environnement européens, la Commission s'engageait à évaluer l'efficacité du dispositif juridique communautaire en matière de substances chimiques. En février 2001, la Commission Européenne présentait le Livre Blanc relatif à la future politique dans le domaine des substances chimiques, REACH (enRegistrement, Evaluation et Autorisation des substances CHimiques) venait de trouver son origine. Le 29 octobre 2003, la proposition REACH est adoptée et en décembre 2005, le projet de texte est voté en première lecture respectivement par le Parlement européen puis par le Conseil de l'Union Européenne (UE) et enfin par le Conseil des Ministres européens de l'industrie. Dès octobre 2006, la proposition en deuxième lecture est faite au Parlement européen. Le 18 décembre 2006, après plus de cinq ans de débats, le Conseil de l'UE adopte à l'unanimité le projet REACH [4], le règlement N°1907/2006 est entré

officiellement en vigueur le 1er juin 2007. Les premiers feuillets et la table des matières, ainsi que certaines annexes du règlement sont donnés en annexe III.

Ce texte constitue un règlement et non une directive, son adoption impliquera donc une application harmonisée et sans délai dans les pays de l'UE. L'entrée en vigueur du règlement est étroitement associée à l'ouverture de l'Agence européenne des produits chimiques (European CHemicals Agency, ECHA), basée à Helsinki (Finlande), il faudra compter environ un an pour que l'Agence devienne opérationnelle. Les exigences fonctionnelles de REACH ont donc commencé à être appliquées à compter de 2008.

3. Agence Européenne des produits chimiques (ECHA)

Le règlement N° 1907/2006 crée l'Agence Européenne des produits chimiques qui est chargée de gérer les aspects techniques, scientifiques et administratifs du système REACH, en veillant à la cohérence des décisions au niveau communautaire. Elle assure donc la gestion des bases de données de l'enregistrement, de la définition de critères pour déterminer les substances prioritaires pour l'évaluation, et de l'édiction d'avis pour les autorisations et les restrictions. Elle élabore aussi les orientations en vue d'assister les producteurs et les importateurs, ainsi que les autorités compétentes, dans la mise en œuvre de ces dispositions. Elle dispose donc d'un rôle centralisateur fort dans les procédures, même si les tests écotoxicologiques sont menés dans les Etats membres.

4. Objectifs, mise en application et impacts

Le système REACH établit donc un système intégré unique d'enregistrement, d'évaluation et d'autorisation des substances chimiques et institue une agence européenne des produits chimiques. Il oblige les entreprises qui fabriquent et importent des substances chimiques à évaluer les risques résultant de leur utilisation et à prendre les mesures nécessaires pour gérer tout risque identifié. En conséquence, son principal objectif est de mieux gérer les risques environnementaux et sanitaires pouvant résulter de la production et de l'utilisation des substances chimiques, permettant ainsi d'offrir aux européens une meilleure protection vis-à-vis des substances chimiques intentionnellement produites et tout en préservant et en renforçant la compétitivité de l'industrie chimique communautaire. Selon ce texte, il incombe désormais aux industriels de la chimie de prouver l'innocuité sur la santé et l'environnement des substances produites ou de déterminer les risques qu'elles engendrent.

Il s'agit probablement de la réglementation la plus ambitieuse et la plus importante de ces vingt dernières années. La nouvelle réglementation REACH change en profondeur la manière dont les substances chimiques sont gérées et oblige les industriels de soumettre aux mêmes procédures, les substances existantes et les nouvelles à travers un schéma établi (figure 1-1). Les entreprises productrices ou importatrices disposeront alors d'un délai de onze ans pour procéder à l'enregistrement officiel des différentes substances qu'elles commercialisent. L'inventaire global ne devrait donc pas être achevé avant 2017, mais les substances les plus dangereuses devront avoir été répertoriées dans les trois ans à venir.

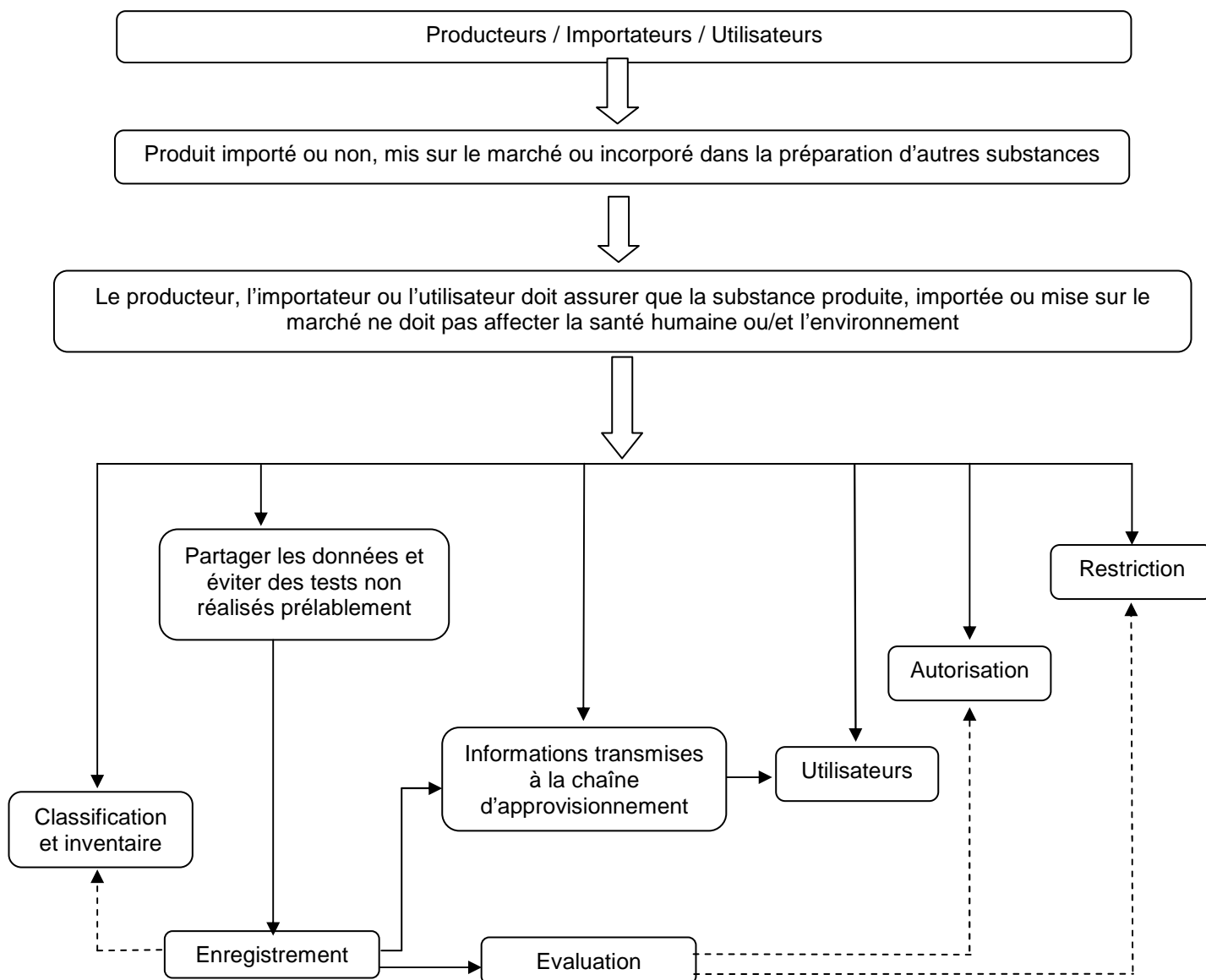


Figure 1-1: Schéma général de la procédure de REACH [2]

Parmi les avantages que l'on peut mentionner figurent une meilleure information sur les propriétés des substances et les composants dangereux des préparations, une gestion des risques facilitée et une rationalisation du nombre de substances. Par ailleurs, la Commission européenne insiste sur la nécessité de promouvoir la compétitivité de l'industrie chimique en encourageant notamment la recherche et le développement de substances chimiques plus sûres. Elle rappelle d'ailleurs le rôle essentiel de la réglementation dans le comportement des entreprises du secteur chimique en matière d'innovation. Un des objectifs de REACH est de s'assurer que les substances chimiques extrêmement préoccupantes soient abandonnées et remplacées par des alternatives appropriées et plus sûres.

5. Aspects réglementaires

Le champ d'application du règlement est vaste puisqu'il couvre toutes les substances qu'elles soient fabriquées, importées, mises sur le marché ou utilisées, telles quelles ou dans des préparations. Dans

un premier temps, il convient d'enregistrer les substances puis de les évaluer afin d'autoriser leur commercialisation et leur industrialisation.

5.1. Enregistrement

L'enregistrement constitue l'élément fondamental du système REACH. Les substances chimiques fabriquées ou importées dans des quantités supérieures à une tonne par an doivent être obligatoirement enregistrées dans une base de données centrale gérée par l'ECHA. Faute d'enregistrement, la substance ne peut être ni manufacturée ni mise sur le marché européen.

L'obligation d'enregistrement s'applique à partir du 1er juin 2008 mais un régime transitoire, allant jusqu'au 1er juin 2018 dans certains cas, est mis en place pour certaines substances qui doivent faire l'objet d'un pré-enregistrement [2, 4].

Quelques groupes de substances sont néanmoins exemptés de l'obligation d'enregistrement, tels que :

- les polymères,
- certaines substances gérées au titre d'une autre législation de l'UE, tels que les médicaments, les aliments ou les substances radioactives,
- certaines substances pour lesquelles le risque estimé est négligeable (eau, oxygène, etc.),
- les substances existantes dans la nature et dont la composition chimique n'est pas modifiée,
- les substances utilisées dans le cadre de la recherche et du développement.

Les raisons d'exemptions sont liées à :

- des directives ou règlements déjà existants (par exemple les substances radioactives sont régies par la directive 96/29/Euratom),
- l'existence de nombreuses formulations commercialisées, rendant le règlement REACH lourd et complexe (par exemple pour les polymères contenant la plupart du temps des additifs),
- l'utilisation de faibles quantités (substances utilisées en laboratoire de recherche).

L'enregistrement exige des industriels (producteurs et importateurs) de fournir des informations relatives aux propriétés, aux utilisations et aux précautions d'emploi des substances chimiques constituant ainsi le dossier technique (cf annexe I). Par ailleurs, une demande d'enregistrement portant sur une substance importée ou produite doit détailler les risques liés à cette substance de même que les différents scénarios d'exposition possibles et les mesures de gestion de ces risques en terme de sécurité chimique (hygiène, sécurité).

Les données requises sont reliées aux volumes de production et aux risques présentés par la substance (par exemple des tests poussés de toxicité concernant les substances fabriquées ou importées pour plus de 1000 tonnes). Un enregistrement moins contraignant s'applique à certains intermédiaires isolés, dès lors qu'ils sont fabriqués ou transportés et utilisés sous contrôle strict et dans des quantités inférieures à 1000 tonnes. Dans ces cas, seules la classification, les mesures de gestion des risques et les informations déjà disponibles concernant les propriétés sont requises. Si le

transport s'effectue sur plus de 1000 tonnes de cette substance, de plus amples informations sont alors requises [3, 4].

De même, un régime spécial s'applique à l'enregistrement des substances présentes dans les produits (cf règlement 1907/2006, annexe XI). Cet enregistrement est aussi obligatoire lorsque la substance en cause est normalement dégagée lors de l'utilisation du produit et lorsque la substance est présente dans les mélanges formulés à raison de plus d'une tonne par producteur ou par importateur par an. Pour les substances mises sur le marché à raison de plus d'une tonne par producteur ou importateur par an et qui ne sont pas ordinairement dégagées mais qui présentent une dangerosité particulière, tout en étant présentes à une concentration supérieure de 0,1%, cette obligation prend la forme d'une simple notification, sur la base de laquelle l'ECHA peut demander un enregistrement.

Comme la réglementation REACH ne comporte pas, à l'heure actuelle, de règles applicables à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances dangereuses, les éléments de la directive 67/548/CEE restent en vigueur. Néanmoins, la Commission est en train de finaliser une proposition de règlement sur la classification, l'étiquetage et l'emballage des substances et préparations. Cette proposition mettra à jour la législation actuelle et reprendra en grande partie le SGH (Système Général Harmonisé pour la classification et l'étiquetage des produits chimiques) conclu au niveau international.

Durant les 11 premières années d'application du système REACH, l'enregistrement devrait porter sur près de 30 000 substances déjà commercialisées. Il est par ailleurs prévu que 80% environ de toutes les substances enregistrées ne nécessiteront aucune étude plus poussée [2].

5.2. Evaluation

L'évaluation permet à l'agence de vérifier que l'industrie respecte ses obligations et évite les essais inutiles sur les vertébrés. Deux types d'évaluation sont prévus : l'évaluation du dossier et l'évaluation de la substance.

L'évaluation du dossier est obligatoire pour toutes les demandes prévoyant certains tests énumérés dans les annexes VI à X du règlement REACH (ce sont les tests les plus exigeants et qui utilisent pour la plupart des vertébrés). Dans ce cas, l'évaluation vise essentiellement à minimiser la nécessité du recours à ce type d'expériences en centralisant les résultats des études écotoxicologiques. L'évaluation du dossier peut également être menée pour vérifier la conformité de l'enregistrement. Il est prévu que l'agence réalise une révision approfondie d'au minimum 5% des dossiers déposés.

Les substances suspectées de présenter un risque pour la santé humaine et l'environnement peuvent également faire l'objet d'une évaluation par les autorités compétentes des États membres afin de déterminer si des informations supplémentaires sont requises. Le programme d'évaluation des substances est développé par l'agence, en coopération avec les autorités compétentes.

Si une substance est suspectée de présenter un risque pour la santé humaine ou l'environnement, l'agence inclura cette substance dans une liste spécifique et un État membre désigné procédera à une évaluation afin de déterminer si des informations supplémentaires sont requises par le déclarant (producteur, importateur, utilisateur).

L'évaluation peut donner lieu aux conclusions suivantes :

- la substance doit être soumise aux procédures de restriction ou d'autorisation,
- la classification et l'étiquetage de la substance doivent être harmonisés en suivant la directive européenne 57/548,
- des informations doivent être fournies aux autres autorités afin de leur permettre d'adopter les mesures appropriées.

En France, l'autorité compétente désignée est représentée par le Bureau de Substances et des Préparations Chimiques faisant partie du MEDAD (Ministère de l'Ecologie, du Développement et de l'Aménagement Durables).

Par exemple, si, au cours de l'évaluation de la substance, des informations sur les mesures de gestion des risques deviennent disponibles (études écotoxicologiques, environnementales), par des études non commanditées lors de l'enregistrement, et qui pourraient avoir un impact sur les conditions d'utilisation de la substance, ces informations devraient être remises aux autorités en charge.

5.3. Autorisation

Toute fabrication, mise sur le marché ou utilisation d'une substance doit faire l'objet d'une demande d'autorisation. Si les risques émanant de la fabrication, de la mise sur le marché ou de l'utilisation peuvent être adéquatement gérés, l'autorisation est accordée. Dans le cas contraire et si des substituts n'existent pas, la Commission évalue le niveau de risque, les avantages socio-économiques de l'utilisation de la substance et décide de son autorisation ou de son retrait.

Une substance chimique est classée comme très préoccupante si elle peut provoquer un cancer, endommager le matériel génétique ou si elle est reprotoxique. La molécule qui répond à ses critères est appelée substance CMR pour Cancérogène, Mutagène ou Reprotoxique. Toute substance qui ne peut être dégradée par la nature (persistante) ou qui s'accumule dans l'organisme des êtres vivants (bioaccumulable), hommes ou animaux, est également classée comme extrêmement préoccupante, même s'il n'existe pas de preuve de leur toxicité. En effet, de nombreuses substances répondant à ces critères se sont révélées toxiques alors même qu'on les pensait au départ inoffensives. Le passé en offre de multiples exemples : les PCB (PolyChloroBiphényles), le DDT (DichloroDiphenylTrichloroethane), les éthers de glycol, l'amiante ou le TBT (TriButylTin). De plus, les substances connues pour interférer avec le système hormonal (appelées perturbateurs endocriniens) sont le dernier groupe de substances pour lequel une autorisation est nécessaire. Les substances très préoccupantes sont soumises à l'autorisation de la Commission en vue d'utilisations particulières. Ces substances, dont l'agence publie et met à jour régulièrement une liste, comprennent :

- les CMR (substances Cancérogènes, Mutagènes et Toxiques pour la Reproduction),
- les PBT (substances Persistantes, Bioaccumulables et Toxiques),
- les vPvB (substances très persistantes et très bioaccumulables),
- certaines substances préoccupantes ayant des effets graves irréversibles sur l'être humain et l'environnement, telles que les perturbateurs endocriniens et les polluants organiques persistants.

Les POPs sont classés parmi les PBT et vPvB. Toutefois, certaines substances, telles que les PBT et les vPvB, peuvent être autorisées uniquement si les avantages socio-économiques excèdent les risques et s'il n'existe pas de substituts.

L'objectif est de garantir que les risques liés à ces substances sont maîtrisés et que ces substances seront progressivement remplacées par d'autres substances ou technologies appropriées lorsque cela sera économiquement et techniquement viable.

Enfin, la charge de la preuve incombe au demandeur. Toutes les autorisations doivent être révisées au bout d'un certain temps et déterminées au cas par cas. Les utilisateurs en aval peuvent affecter une substance à une utilisation autorisée, à condition qu'ils se procurent ladite substance auprès d'une entreprise à laquelle une autorisation a été accordée et s'ils respectent les conditions dont a été assortie cette autorisation. Ils sont néanmoins tenus d'en informer l'agence afin que les autorités soient pleinement avisées de l'utilisation qui est faite des substances très préoccupantes en cours d'évaluation.

6. Informations - Utilisateurs - Restrictions

Le règlement prévoit que les données de sécurité soient obligatoirement transmises par les chaînes d'approvisionnement des industriels. Celles-ci doivent permettre à ceux qui utilisent les substances chimiques dans leur propre processus de production de pouvoir le faire de manière sûre et responsable, ni présenter de risques pour l'environnement. Cela implique que l'information soit transmise à tous les acteurs qui interviennent dans la chaîne d'approvisionnement, de fabrication et de distribution.

Les données transmises concernent, entre autres, l'identification de la substance, sa composition et ses propriétés, les mesures à prendre pour son utilisation et son transport sans risque. Elles doivent indiquer aussi les mesures en cas de dispersion accidentelle ou d'incendie, ainsi que les informations toxicologiques et écologiques. Les informations sensibles, telles que celles liées au procédé de formulation et celles à caractère commercial, ne seront pas tenues d'être transmises.

Les dispositions relatives à l'inventaire des classifications et des étiquetages garantissent que les classifications de toutes les substances dangereuses fabriquées ou importées dans l'UE soient à la disposition de tous les acteurs concernés. Les entreprises sont ainsi tenues d'inclure toutes les classifications dans l'inventaire géré par l'agence. Toutes les divergences entre les classifications d'une même substance devraient être éliminées au fil du temps. Des classifications harmonisées au niveau de l'UE ne sont requises que pour les propriétés suivantes : substances cancérigènes, mutagènes ou toxiques pour le système reproductif ou allergènes respiratoires ; ces classifications harmonisées sont ajoutées à l'annexe de la directive 67/548/CEE. Les informations non confidentielles sur les substances chimiques seront disponibles, notamment pour aider les personnes exposées à ces substances à prendre une décision quant à l'acceptabilité des risques encourus.

Les utilisateurs en aval sont tenus d'examiner la sécurité des utilisations des substances et de prendre des mesures de gestion des risques appropriées. Ces dispositions permettent également aux autorités d'avoir une vue d'ensemble des utilisations qui sont faites d'une substance lorsque celle-ci

parcourt la chaîne d'approvisionnement. Le cas échéant, un complément d'information sera demandé afin de prendre les mesures appropriées.

Les propositions de restrictions peuvent concerner les conditions de fabrication, la ou les utilisations, et/ou la mise sur le marché d'une substance, ou encore l'interdiction éventuelle de ces activités au besoin. Elles sont élaborées par les États membres ou par l'agence (à la demande de la Commission) sous forme d'un dossier structuré.

L'incitation à la recherche et l'innovation sont intégrées dans REACH. Entre autres, le nouveau système encourage la recherche en relevant le seuil d'enregistrement accordé sous la législation précédente qui était de 10 kg à 1 tonne et exempte d'autorisation ou de restriction les activités de recherche. En outre, les substances fabriquées ou importées pour ce type d'activité peuvent être exemptées d'enregistrement pour une période pouvant aller jusqu'à 15 ans.

7. Conclusion

Le système REACH ambitionne d'établir un cadre réglementaire européen afin de combler le déficit de connaissances des risques environnementaux engendrés par la production de nombreuses substances chimiques. Les objectifs de ce système sont donc d'identifier, d'inventorier ces substances et d'éliminer progressivement les plus toxiques.

La mise en place d'un tel système et la réalisation de ces objectifs ne peuvent s'envisager sans la mise en place de méthodes d'analyse robustes, fiables et reproductibles des molécules dites prioritaires dans l'environnement.

Etant donné le grand nombre de substances existantes sur le marché, la priorité absolue a été donnée aux substances qui sont responsables d'une exposition importante ou qui sont préoccupantes en raison de leurs propriétés dangereuses connues ou suspectées (propriétés physico-chimiques, toxicologiques et écotoxicologiques). Dans le cadre de notre projet de recherche, nous avons dressé une liste de 33 substances susceptibles d'être présents dans l'environnement Rhône-Alpin.

Les matrices environnementales qui ont été analysées sont d'une part des matrices aqueuses constituées par des eaux de rivière, souterraines et des effluents de station d'épuration, et d'autre part des matrices solides constituées par des échantillon de sols, poussières, sédiments et boues de station d'épuration.

I.2 Polluants Organiques Persistants (POPs),
Perturbateurs Endocriniens (PEs) et substances
émergeantes présentes
dans les matrices environnementales

1. Introduction

Comme nous l'avons vu précédemment, la production et l'utilisation, sans contrôle, de nombreuses substances entraînent certains risques pour la santé humaine et l'environnement. Notre société moderne a besoin de substances chimiques et l'industrie européenne représente une part importante de l'activité économique de l'Europe. REACH propose de répondre au double problème environnemental et sanitaire tout en respectant les besoins industriels.

Notre projet s'inscrit dans la recherche de ces substances dans l'environnement permettant la constitution des dossiers nécessaires aux industriels.

Dans une première partie nous présenterons les substances dites prioritaires pour l'environnement Rhône-Alpin, une sélection de 33 molécules a été réalisée sur lesquelles nous avons basé notre étude (cf annexe IV) ; puis nous exposerons leur devenir et leur occurrence dans l'environnement. Enfin, nous nous intéresserons aux deux compartiments environnementaux que nous avons analysés au cours de cette étude, les matrices aqueuses et les matrices solides.

2. Polluants Organiques Persistants (POPs) et Perturbateurs Endocriniens (PEs)

De manière générale, il existe 2 types de familles de molécules pouvant affecter la faune, la flore et les êtres humains. Ces substances sont associées à leurs effets sur la nature et caractérisées par leur devenir et leurs concentrations dans l'environnement et les écosystèmes ; nous distinguerons les Polluants Organiques Persistants (POPs) et les Perturbateurs Endocriniens (PEs).

2.1. POPs

2.1.1. Définition

Les polluants organiques persistants (POPs) sont des substances chimiques qui possèdent certaines propriétés toxiques et qui, contrairement à d'autres produits chimiques, résistent à la dégradation tout en se propageant facilement dans le milieu naturel, ce qui les rend particulièrement nuisibles à la santé humaine et à l'environnement.

Ils sont définis à partir de 4 propriétés [5] :

- **Toxicité** : plusieurs impacts prouvés sur la santé humaine.
- **Persistance dans l'environnement** : molécules résistantes aux dégradations biologiques naturelles, se dégradent de moins de 50 % sur une durée de 7 à 8 ans.
- **Bioaccumulation** : accumulation dans les tissus vivants et augmentation des concentrations le long de la chaîne alimentaire.
- **Transport longue distance** : de par leurs propriétés de persistance et de bioaccumulation, ces molécules ont tendance à se déplacer sur de très longues distances et à se déposer loin des lieux d'émission via les compartiments environnementaux (air, sol, eau).

Plusieurs dizaines de familles de molécules organiques sont susceptibles de répondre à ces critères, dans notre étude les pesticides sélectionnés peuvent répondre à certains de ces critères, tels que leur bioaccumulation ou leur transport sur de longues distances. Aujourd'hui, étant donné l'impact planétaire de ces composés, deux textes internationaux récents visent à réglementer ces derniers (le protocole d'Aarhus signé en juin 1998 et la convention de Stockholm signée en mai 2001). Ces textes ont établi une première liste nominative de POPs. Les substances qui font partie de ces listes se répartissent en trois catégories :

- celles produites non intentionnellement par des activités humaines,
- celles issues de la fabrication et de l'utilisation de produits chimiques,
- celles issues de l'utilisation de pesticides.

La Convention de Stockholm vise une interdiction progressive de la production et de l'utilisation de 12 catégories de POPs actuellement concernés (l'aldrine, le chlordane, le DDT, la dieldrine, les dioxines, l'endrine, les furanes, l'heptachlore, l'hexachlorobenzène, le mirex, les PCBs et le toxaphène). Elle a pour objectif principal de protéger la santé humaine et l'environnement des effets néfastes des POPs au niveau mondial.

2.1.2 Impacts sur l'environnement des POPs

Les POPs présentent des effets toxiques sur la santé humaine et sur la faune. Ils sont associés à une vaste gamme d'effets nuisibles :

- dégradation du système immunitaire,
- effets sur la reproduction et sur le développement,
- propriétés cancérigènes.

De par leur nature persistante, ces molécules présentent la particularité de provoquer des perturbations par une exposition chronique même à de faibles concentrations. En outre, par leur propriété de bioaccumulation, les impacts sur la faune et la santé humaine peuvent être observés à proximité mais aussi très loin des sources d'émission.

2.1.3. POPs choisis – Les pesticides

Les produits phytosanitaires sont largement utilisés et répandus dans l'environnement. Ils atteignent la faune et la flore par contact direct entraînant leur bioaccumulation et leur circulation dans la nature, et les populations par la consommation des fruits et légumes mais aussi par la consommation d'eaux potables « contaminées ».

Le terme pesticide, dérivé du mot anglais pest (« ravageurs »), désigne les substances ou les préparations utilisées pour la prévention, le contrôle ou l'élimination d'organismes jugés indésirables, qu'il s'agisse de plantes, d'animaux, de champignons ou de bactéries. Dans le langage courant, le terme pesticide est généralement associé à un usage agricole de ces substances, or il englobe également les usages domestiques, urbains, de voirie... Dans le domaine de l'agriculture, on les appelle produits phytopharmaceutiques ou phytosanitaires. Il existe principalement trois catégories : les herbicides (pour lutter contre les mauvaises herbes), les fongicides (pour lutter contre les champignons) et les insecticides (pour lutter contre les insectes). D'autres produits spécifiques existent pour une action sur les rongeurs (rodenticides), sur les escargots et les limaces (molluscicides)...

Environ 76 000 tonnes de matières actives ont été consommées en France en 2004, 220 000 tonnes sont annuellement épandues dans l'environnement européen. L'Union Européenne en est le principal producteur et 72% des ventes sont destinées au marché communautaire. Au total, quelques 100 000 substances existantes, dont les pesticides, sont susceptibles d'entrer en contact avec l'Homme ou l'Environnement (dont plus de 30 000 sont commercialisées à plus d'une tonne par an et par fabricant). L'application de ces produits génère des résidus souvent bien plus nocifs sur l'environnement et la santé que leurs précurseurs.

Du fait de leur large production, de leur toxicité et de leur contact direct avec l'environnement, nous avons sélectionné pour notre étude 20 pesticides, dont 2 OrganoPhosphorés (OPPs), 8 OrganoChlorés (OCPs), 2 carbamates et 8 fongicides.

Certains sont clairement identifiés comme POPs, les organochlorés, d'autres sont moins persistants mais subsistent dans l'environnement à cause de leur emploi constant. Tous ont fait l'objet de directives européennes en vue de leur réglementation et sont susceptibles de remplir les conditions présentées dans l'annexe XIII de la directive du système REACH.

2.1.3.1. Organophosphorés (OPPs)

Utilisations – Structures - Caractéristiques

Les OPPs sont employés en tant qu'insecticides et acaricides sur une large variété de céréales et de cultures maraîchères dans le domaine agricole mais aussi en usage domestique, néanmoins leur utilisation est d'ores et déjà limitée en France. Comme leur nom l'indique, ils dérivent de l'acide phosphorique (phosphate, phosphonate, halogénatephosphoramide). Un ou deux atomes d'oxygène

peuvent être remplacés par le soufre pour donner des pyrothiophosphates, des phosphorothioates, des phosphorodithioates.

Deux OPPs, le méthamidophos et le diméthoate (cf figure 1-2), ont été choisis, le premier pour sa toxicité, DL 50 pour les rats de 13 mg.kg⁻¹ [6] le second pour sa forte utilisation, 53 tonnes utilisées en 1995, le diméthoate est l'OPP le plus utilisé en Europe [7].

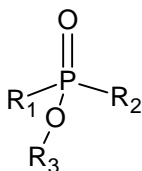


Figure 1-2 : Structure chimique des organophosphorés

Composés	R ₁	R ₂	R ₃
<i>Diméthoate</i>	SCH ₂ CONHCH ₃	OCH ₃	CH ₃
<i>Méthamidophos</i>	NH ₂	SCH ₃	CH ₃

De par leurs propriétés physico-chimiques (tableau 1-1), solubilités élevées dans l'eau et Log Kow faibles, signifient que les OPPs se retrouvent principalement dans les eaux environnementales et peuvent poser un problème de santé publique par les pollutions de l'eau potable, néanmoins leur persistance est moins importante que pour les OCPs.

Composés	Solubilité dans l'eau (mg/L à 20°C)	Log Kow	Ecotoxicologie (DL 50 Oral Rats en mg/kg)	Hydrolyse (jours à 20°C)
<i>Méthamidophos</i>	> 200000	-0,80	13-16	5-27
<i>Diméthoate</i>	23300	0,70	150-387	68

Tableau 1-1 : Caractéristiques physico-chimiques des OPPs [6, 8]

Le log de Kow traduit l'hydrophobicité d'une molécule lorsqu'il est supérieur à 3 et sa capacité à s'accumuler dans les sols. Néanmoins, une étude des résultats obtenus sur les OPPs [9] montre que ces molécules peuvent être beaucoup plus toxiques et contaminer les sols pour plusieurs années. Les OPPs sont mutagènes et tératogènes et leur toxicité peut être également mise en corrélation avec des maladies du système nerveux et immunitaire.

2.1.3.2. Organochlorés (OCPs)

Utilisations – Structures – Caractéristiques

Synthétisés et utilisés à partir des années 40, les pesticides organochlorés dits "de première génération" sont aujourd'hui strictement interdits dans de nombreux pays industrialisés, certains depuis les années 70. En effet, les insectes ont rapidement développé une résistance contre ces molécules, et des doses considérables de ces pesticides ont alors été répandues afin d'effectuer des traitements efficaces des cultures. Difficilement biodégradables et fortement persistants dans l'environnement (tableau 1-2), ils restent encore aujourd'hui de redoutables polluants des sols et des milieux aquatiques [10-13]. Certains présentent une durée de vie particulièrement longue (supérieure à 10 ans) et sont ubiquitaires, de sorte qu'ils persistent de nombreuses années dans le sol, mais également au niveau des tissus humains. L'accumulation des organochlorés chez les animaux et chez

l'homme est très importante dans le tissu grasseux mais aussi dans le foie, les muscles et le lait maternel [14, 15]. De nombreux représentants de cette catégorie sont actuellement interdits du fait de leur neurotoxicité.

C'est pour cette persistance que nous avons choisis les composés suivant : le o,p'-DichloroDiphénylTrichloroéthane (DDT), p,p'-DDT et ses métabolites DichloroDiphényldichloroÉthylène (o,p'-DDE et p,p'-DDE) et DichloroDiphénylDichlorométhane (o,p'-DDD et p,p'-DDD), le méthoxychlor (Dimethoxy-DDT) et son métabolite le 2,2-bis(p-HydroxyPhényl)-1,1,1-TrichloroEthane (HPTE). Les structures moléculaires sont données en annexe IV.

Composés	Solubilité dans l'eau (mg/L à 20°C)	Log Kow	Ecotoxicologie (DL 50 Oral Rats en mg/kg)	Hydrolyse (jours à 20°C)
<i>DDT</i>	< 0,09	6,8-6,9	115	Très persistant
<i>DDD</i>	< 0,10	5,9-6,0	3400	Très persistant
<i>DDE</i>	< 0,14	6,0-6,5	1000	Très persistant
<i>Méthoxychlore</i>	0,10 (a)	5,08	6000	Très persistant
<i>HPTE</i>	4,83 (a)	4,55	Fétotoxique, protogénique	NE

Tableau 1-2 : Caractéristiques physico-chimiques des OCPs, (a) mesuré à 25°C, NE Non Evaluée [16, 17]

2.1.3.3. Carbamates et thiocarbamates

Utilisations – Structures - Caractéristiques

Les carbamates, figure 1-3, représentent une alternative aux OCPs et sont des pesticides qui présentent l'avantage d'être beaucoup moins rémanents que les OPPs ou les OCPs. Néanmoins, la forte consommation mondiale, comprise entre 25 000 et 35 000 tonnes par an, fait de cette famille de pesticides l'une des plus couramment utilisée [18]. Le propoxur est de loin le plus utilisé de nos jours, aussi bien dans le domaine agricole que pour l'usage domestique (Baygon®).

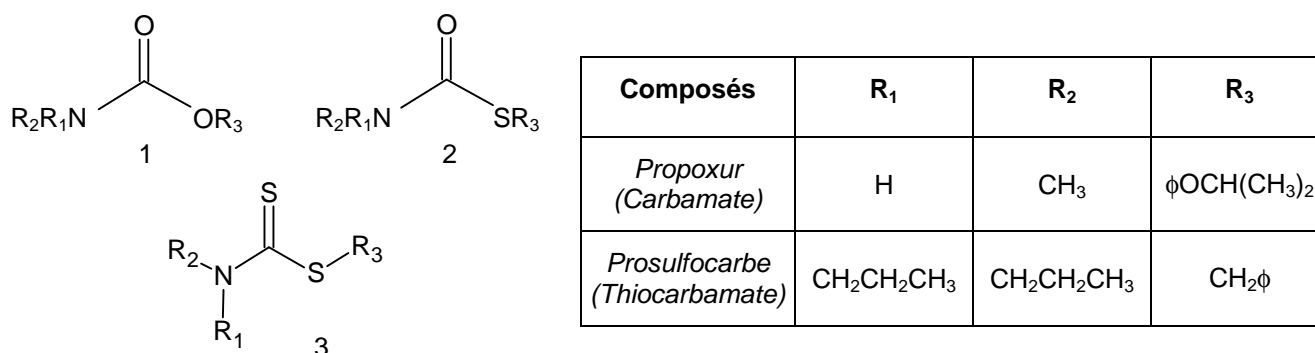


Figure 1-3 : Structure chimique générale des carbamates (1), des thiocarbamates (2) et des dithiocarbamates (3)

Les dithiocarbamates (figure 1-3), tel le mancozèbe, le manèbe et le propinèbe, sont employés comme pesticides mais aussi dans d'autres domaines d'applications comme l'industrie du papier et du

caoutchouc en tant qu'antioxydants et accélérateurs de vulcanisation. Leur neurotoxicité est forte et leur rapide dégradation métabolique et environnementale conduit à la formation d'éthylèneithiourée [19] ou 2-imidazolidinethione, qui est une molécule beaucoup plus persistante et toxique (tableau 1-3). En effet, elle est suspectée de causer des effets pathogènes variés (neurotoxique, goïtrogénique, carcinogénique, mutagénique, tératogénique) [20].

Composés	Famille	Solubilité dans l'eau (mg/L à 20°C)	log Kow	Ecotoxicologie (DL 50 Oral Rats en mg/kg)	Hydrolyse (jours à 20°C)
<i>2-Imidazolidinethione</i>	Résidu de dégradation des thiocarbamates	20000 (a)	-0,66	1832	> 90
<i>Propoxur</i>	carbamates	1750	1,56	50	93
<i>Prosulfocarbe</i>	carbamates	13,2	4,65	1820	31

Tableau 1-3 : Caractéristiques physico-chimiques des carbamates et thiocarbamates, (a) 30°C, [6, 19]

Ces molécules sont très solubles (tableau 1-3) ce qui explique le fait qu'on les détecte dans de nombreuses nappes phréatiques et cours d'eau.

Les deux carbamates choisis pour l'étude sont donc le propoxur et le prosulfocarbe et le résidu de la dégradation des thiocarbamate, le 2-imidazolidinethione (figure 1-4).

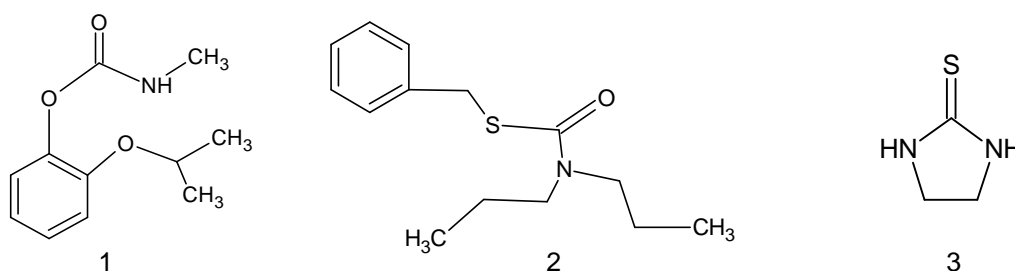


Figure 1-4 : Propoxur (1), prosulfocarbe (2) et 2-imidazolidinethione (3)

2.1.3.4 Fongicides

Utilisations – Structures - Caractéristiques

Les fongicides représentent plus de la moitié du marché des produits phytosanitaires en France. Des limites d'exposition maximales ont été données dans la directive 642/1990 de l'UE afin de garantir la santé publique. Nous avons sélectionné 7 fongicides parmi les plus utilisés dans le domaine agricole en Europe et parmi ceux présentant les caractéristiques physico-chimiques (tableau 1-4) les plus importantes vis-à-vis de leur persistance et de leur toxicité dans l'environnement : fluquinconazole, bromuconazole, tébuconazole, tétraconazole et l'hexaconazole pour les fongicides triazoles et

diméthomorphe, fongicide de la famille des morpholines et le pyridabène, fongicide pyridazinone (cf figure 1-5).

Composés	Solubilité dans l'eau (mg/L à 20°C)	Log Kow	Ecotoxicologie (DL 50 Oral Rats en mg/kg)	Hydrolyse (jours à 20°C)
Fluquinconazole	1	3,24	112	22
Bromuconazole	50	3,24	365	Très persistant
Tébuconazole	32-36	3,70	4000	Très persistant
Tétraconazole	156	3,56	1248	Très persistant
Hexaconazole	17-18	3,90	2189	30
Diméthomorphe	49	2,68	3900	70
Pyridabène	0,012	6,37	820-1350	Très persistant

Tableau 1-4 : Caractéristiques physico-chimiques des fongicides [6]

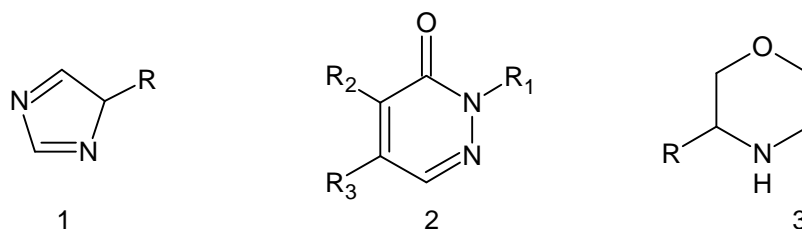


Figure 1-5 : Structures de base des triazoles (1), des morpholines (2), des pyridazinones (3)

2.2. Perturbateurs Endocriniens (PEs)

2.2.1 Définition

Durant ces trente dernières années, des études [21-23] ont montré que les nombreuses substances chimiques rejetées dans l'environnement, incluant les hormones naturelles et synthétiques, les pesticides, les additifs utilisés dans l'industrie du plastique et des surfactants, pouvaient perturber les mécanismes de fonctionnement des systèmes endocriniens pour un certain nombre d'espèces aquatiques et de la faune sauvage.

Par définition, un PE est un agent exogène qui interfère avec la synthèse, la sécrétion, le transport, la liaison, l'action ou l'élimination *in vivo* des hormones naturelles responsables de la maintenance de l'homéostasie (équilibre hormonal), de la reproduction, du développement et du comportement [24].

2.2.2. Hormones naturelles et/ou de synthèse

Elles regroupent la progestérone et la testostérone (figure 1-6), les œstrogènes et leurs dérivés naturellement sont présents dans l'organisme des hommes et des animaux, et les phytoœstrogènes sont présents dans certaines plantes. L'organisme humain est capable de décomposer facilement et d'excréter rapidement toutes ces substances. Elles restent très peu de temps dans l'organisme et ne s'accumulent pas dans les tissus comme c'est le cas de certaines substances anthropiques (hormones sécrétées par l'homme).

Les hormones de synthèse, y compris celles qui sont identiques aux hormones naturelles, telles que contraceptifs oraux, traitements hormonaux de substitution et certains additifs alimentaires pour animaux par exemple, sont spécialement conçues pour agir sur le système endocrinien et le moduler. La très forte consommation d'aliments contenant ces substances conduit à se poser la question des risques associés à celle-ci.

Au final, des hormones naturelles et/ou des produits de synthèse se retrouvent dans les rejets humains, animaux, végétaux ou industriels. Ainsi, une étude a montré que, dans l'eau, la principale source de perturbateurs endocriniens est constituée par les rejets humains (œstrogènes naturels...) suivie par les rejets industriels [23].

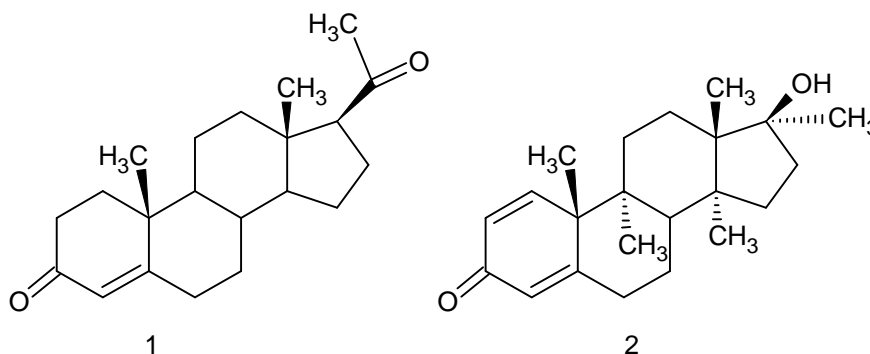


Figure 1-6 : Hormones naturelles, progestérone (1) et testostérone (2)

Cette famille de molécules ne fait pas partie de cette étude car une méthode analytique a déjà été mise au point pour la détection et la quantification de stéroïdes et corticostéroïdes dans les effluents et elle a permis de les détecter à des concentrations de l'ordre du µg/L dans les effluents des STEP de St Fons et de Pierre-Bénite (Rhône, France) [22].

2.2.3. Substances anthropiques

Ces substances comprennent les produits chimiques conçus pour être utilisés dans l'industrie (par exemple, dans certains produits d'entretien industriels comme l'octylphénol (2), figure 1-7), dans l'agriculture (pesticides) et dans des biens de consommation (additifs des plastiques tel que le bisphénol A (1), figure 1-7). Cette catégorie comprend aussi les substances chimiques qui sont des sous-produits industriels, comme les dioxines et les furanes, suspectées d'influer sur le système endocrinien de l'homme et de l'animal. Ils sont appelés aussi perturbateurs endocriniens industriels et/ou domestiques.

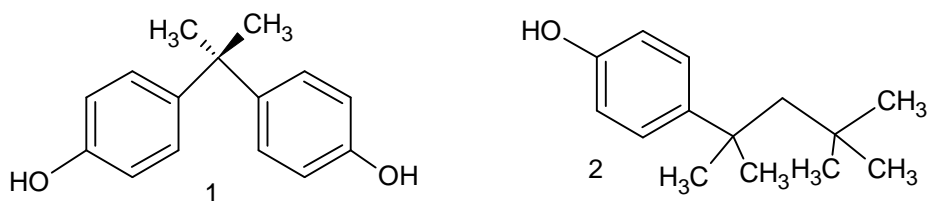


Figure 1-7 : Substances anthropiques étudiées, Bisphénol A (1) et tert- Octylphénol (2)

2.2.4. Impacts sur l'environnement [24]

Les PEs vont essentiellement toucher les organismes vivants et provoquer le développement de cancers des systèmes reproducteurs, une diminution de la production de gamètes en induisant un dérèglement au niveau des hormones stéroïdiennes. Les effets écologiques observés sur les poissons, reptiles, invertébrés, oiseaux sont :

- altération du sex-ratio dans certaines espèces,
- féminisation des mâles, développement anormal des systèmes reproducteurs,
- diminution de la fertilité, du succès d'éclosion des œufs et diminution de la survie de la descendance.

Les PEs potentiels sont représentés par :

- les hormones « naturelles », dites endogènes, (estrogènes, progestérone, testostérone, phytoestrogènes),
- les substances de synthèse, dites exogènes, incluant :
 - o les substances à activité hormonale de synthèse (contraceptifs, hormones de substitution, additifs à alimentation animale,...) utilisées intentionnellement pour leurs effets endocriniens,
 - o les substances chimiques à usage industriel, agricole, domestique incluant leurs produits de dégradation (dioxines,...).

2.2.5 PEs domestiques et industriels choisis

2.2.5.1. Alkylphénols

Utilisations

De nombreux produits manufacturés, domestiques ou industriels, sont vendus sous forme de formulations prêtes à l'emploi. Ces formulations nécessitent des additifs permettant d'améliorer l'efficacité des substances actives en jouant plusieurs rôles, celui de dispersant, d'émulsifiant, d'agent anti-mousse, d'agent mouillant, de conservateur, etc... Ces additifs entrent dans la composition de nombreux produits dont les détergents domestiques, les formulations de pesticides, de peintures et sont également utilisés dans les industries du textile, du cuir et des cosmétiques.

Notons que beaucoup de recherches ont été réalisées sur les substances actives des formulations de pesticides [10, 25-27] mais seulement quelques travaux se sont axés sur les additifs comme sources de contamination environnementale des sols et des eaux [21, 28-32].

Les surfactants non ioniques constituent la majeure partie de ceux employés à la fois dans l'industrie et dans les produits à usage domestique, ils sont représentés par les alkylphénols. Les molécules les plus utilisées sont les NonylPhénols (NPs), NonylPhénols polyEthOxylates (NPnEOs), OctylPhénols (OPs) et OctylPhénol polyEthOxylates (OPnEOs).

Structures et caractéristiques

Les formulations des AlkylPhénols EthOxylés (APnEOs) sont bien souvent complexes et constituent un mélange d'homologues avec un nombre varié de groupements éthoxylés et d'isomères. Une formulation industrielle standard comporte environ 10 isomères d'APs portant entre 1 et 20 groupes éthyloxy [30].

La synthèse, acidocatalysée, des APnEOs débute par l'alkylation du phénol par un mélange d'oléfines de formule C_xH_{2x} . Un mélange d'isomères de position du nonène est employé pour la synthèse des NPs et un mélange d'isomères du triméthylpentène pour les OPs [33]. On comprend alors que le mélange de nonylphénols obtenu est composé de phénol avec un mélange d'isomères de position le long de la chaîne alkyle. Le triméthylpentène quant à lui réagit pour former majoritairement le tert-octylphénol. Le groupement $-OH$ du noyau benzénique étant mésomère donneur, il oriente la substitution électrophile aromatique sur les positions ortho et para du noyau phénol. Une majorité de para-APs est obtenue industriellement. Les APnEOs sont quant à eux synthétisés à partir de l'oxyde d'éthylène et des APs en présence de KOH [34] (figure 1-8).

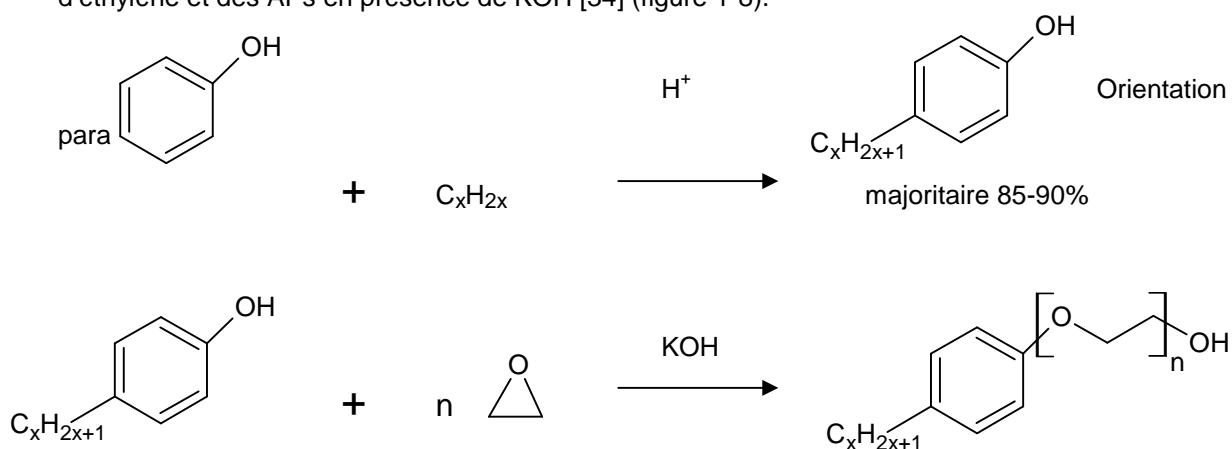


Figure 1-8 : Voies de synthèse industrielle des APs et APnEOs [34]

On estime la production mondiale des APs et des APnEOs à plus de 500 000 tonnes par an dont 80 % sont des NPs, OPnEOs ou NPnEOs, et dont environ 60 % se retrouvent dans l'environnement [35]. Bien que les APnEOs ne soient pas classés comme très toxiques, leurs produits de dégradation (majoritairement les OPs, NPs et leurs dérivés mono- et diéthoxylates carboxylés ou non) sont considérés comme des perturbateurs endocriniens [29, 36]. Par ailleurs, leur forte utilisation généralisée à de nombreux domaines provoque une exposition chronique.

Des exemples de structures de ces molécules étudiées dans ce travail sont représentés sur la figure 1-9. Comme indiqué sur la figure 1-8, les formulations industrielles contiennent une grande variété d'isomères de chaînes alkyles et de nombre de groupements éthoxylates.

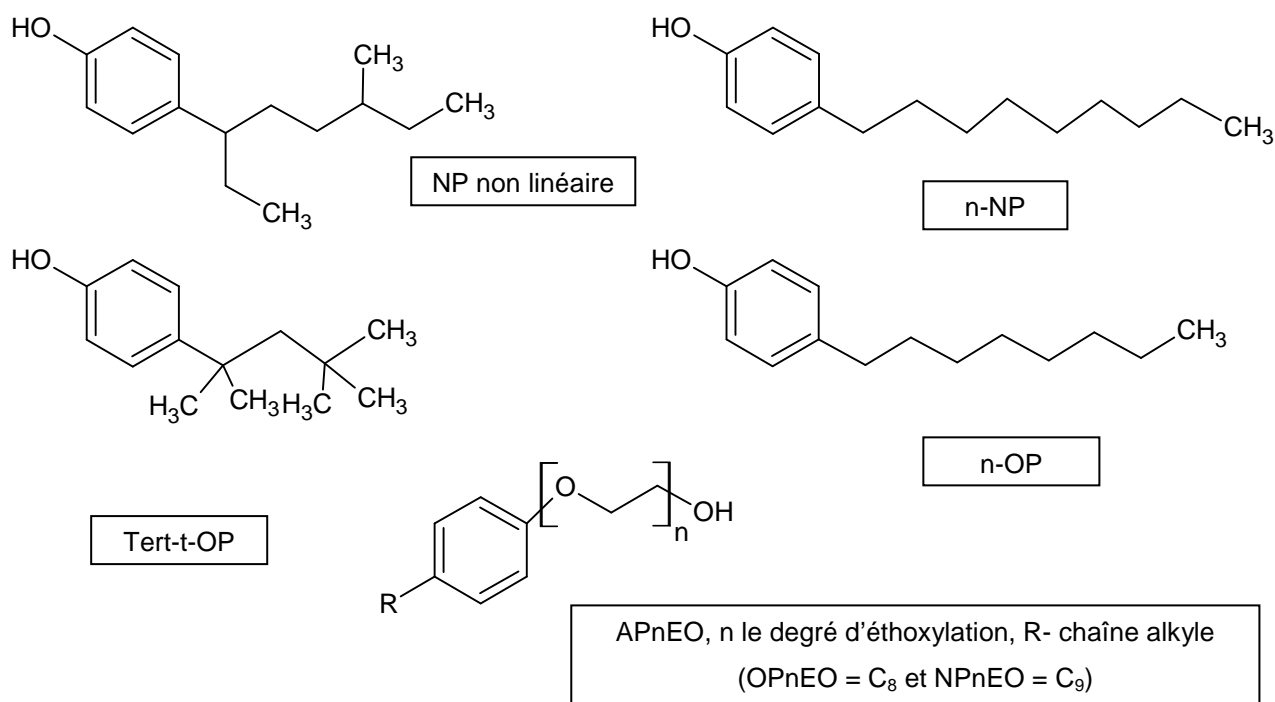


Figure 1-9 : Exemples d'AlkylPhénols (APs) et AlkylPhénols EthOxylés (APnEO)

Ces molécules sont constituées de deux fragments spécifiques, une partie alkyle et une partie phénol ou éthoxylate, ce qui leur confère une faible solubilité dans l'eau, comprise entre 3 et 24 mg/L (à 20°C) [37]. La solubilité des APnEOs dépend du nombre de groupements polaires présents sur la partie hydrophile de la molécule ; plus le degré d'éthoxylation (n) est faible plus la molécule est considérée comme insoluble dans l'eau ou lipophile, inversement plus n est élevé plus la molécule sera soluble dans l'eau ou hydrophile [38]. Les APnEOs sont hydrophiles avec une forte solubilité dans l'eau ainsi que des Log Kow compris entre 3,9 et 4,21. Ceci leur confère une capacité à s'accumuler sur les matrices solides environnementales ainsi que dans les tissus graisseux des animaux [37-39]. Les APs sont faiblement solubles dans l'eau avec un Log de Kow similaire aux formes éthoxylées, ceci nous permet de conclure que les quantités retrouvées dans ces compartiments seront plus faibles que dans le cas des APnEOs. Néanmoins, ces composés restent problématiques du fait de leur grande persistance [31, 35, 39].

Les caractéristiques physico-chimiques des APs sont regroupées dans le tableau 1-5.

Composé	Solubilité dans l'eau (mg/L à 25°C)	Log Kow	Ecotoxicologie (DL 50 Oral Rats en mg/kg)	Hydrolyse (jours à 20°C)
NPs	3 - 11	~ 5,71	NE	> 16
4n-NP		4,48	NE	Très persistant
NP ₁ EO	Très soluble	4,17 – 4,21	NE	Très persistant
NP ₂ EO			3550	Très persistant
NP ₃ EO			NE	Très persistant
OPs	~ 5	~ 4,12	NE	Très persistant
Tert-OP	3,11	5,50	NE	Très persistant
OP ₁ EO	Très soluble	3,9 – 4,0	NE	Très persistant
OP ₂ EO			NE	Très persistant
OP ₃ EO			NE	Très persistant

Tableau 1-5 : Caractéristiques physico-chimiques des APs et APnEOs, NE (Non Evaluée) [37-39]

Toxicologie

Plusieurs études [39, 40] ont prouvé la toxicité de ces composés sur les animaux marins, les invertébrés aquatiques et les poissons. Une étude sur les crustacés a montré que la Concentration Léthale à 48 h (48 h CL50) pour les APnEOs et NPs est d'environ 0,2 mg.L⁻¹, la CL50 étant la concentration en substance active pour laquelle 50% de la population exposée meurt sur une période donnée. Il a été observé que la toxicité des APs augmente généralement lorsque la chaîne hydrophobe augmente et lorsque la chaîne ethoxylate diminue [41]. De ce fait les APs sont considérés comme plus toxiques que les APnEOs [33].

Pour un grand nombre d'organismes vivants, les métabolites sont toxiques à partir d'une concentration de quelques centaines de µg.L⁻¹ (CL50 à 96h sur invertébrés et poissons) [38, 40, 42] et ont la capacité de pouvoir se fixer sur les récepteurs des oestrogènes. Ils peuvent également induire des modifications biologiques sur les organismes, par exemple, une concentration en APs supérieure à 20 µg.L⁻¹ provoque une production de vitellogénine chez les mâles alors que la vitellogénine est une protéine précurseur dans la production des œufs chez les poissons femelles. Enfin, il a été démontré que le NP, NP₁EO et NP₁EC empêchent l'activité mitochondriale de la cellule et bloque la production d'ATP (Adénosine TriPhosphate, source d'énergie du muscle) [39, 43].

Toutes ces données montrent la nécessité d'identifier et de quantifier ainsi que de connaître la répartition de ces composés dans l'environnement. Sur la base des études toxicologiques réalisées sur les animaux, on peut extrapoler les mêmes effets sur les êtres humains, à savoir des perturbations de l'activité endocrinienne [40]. On peut considérer que le dépassement d'une concentration de toutes les formes alkylphénoliques de quelques dizaines de µg.L⁻¹ dans l'eau potable est une valeur seuil à ne pas dépasser.

2.2.5.2. *Phtalates et Bisphénol A*

Utilisations

Parmi les PEs industriels et domestiques, le bisphénol-A (BPA), (figure 1-7), est un contaminant industriel et environnemental inscrit sur la liste des substances prioritaires (Bureau Européen des substances Chimiques, 2003). Environ 700 000 tonnes sont utilisées chaque année en Europe [44]. Il s'agit du monomère de base dans le cadre de la synthèse des plastiques, il est utilisé pour la synthèse des résines époxy, de polycarbonates ainsi que de retardateurs de flamme. Les résines sont employées comme laque pour recouvrir les produits métalliques tels que les boîtes de conserves et les cannettes mais également dans les résines dentaires. Les polycarbonates sont utilisés pour les emballages de nombreuses boissons et aliments. Le bisphénol A est également utilisé dans la fabrication d'adhésifs, de peintures, de disques compacts, de verres optiques...

Deux phtalates, le DiEthylHexylPhtalate (DEHP) et le DiButylPhtalate (DBP) sont largement employés comme adjuvants dans les PVC et agents fixateurs ou vecteurs dans les produits cosmétiques, encres, matières plastiques alimentaires ou médicales, adhésifs... Ils sont reconnus comme dangereux pour la santé et classés toxiques pour la reproduction car ils provoquent des troubles du développement des testicules et perturbent la régulation des hormones par le foie [45]. Les composés tels que les phtalates sont susceptibles de migrer à travers les emballages alimentaires, le DEHP et le DBP (figure 1-10) sont tous les deux présents sur la liste de REACH et sont interdits, depuis 2003, dans les matériaux plastiques constituant les jouets.

Structures – Caractéristiques

Le BPA, le DEHP et le DBP ont respectivement une solubilité dans l'eau de 120 ; 0,27 et 11,2 mg.L⁻¹ (tableau 1-6) et des Log Kow compris entre 3,32 et 7,50 ce qui leur confère une forte bioaccumulation [46].

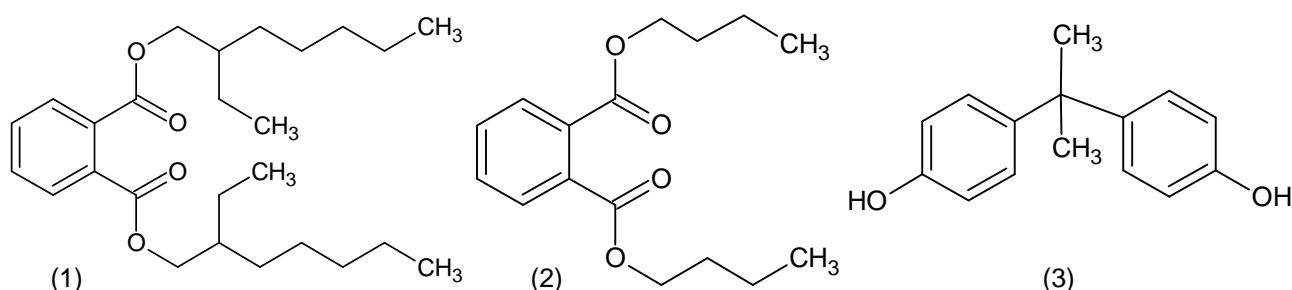


Figure 1-10 : Formule moléculaire des DEHP (1), DBP (2) et BPA (3)

Composé	Solubilité dans l'eau (mg/L à 25°C)	Log Kow	Ecotoxicologie (DL 50 Oral Rats en mg/kg)	Hydrolyse (jours à 20°C)
DBP	11,2	4,45	8000	Très persistant
DEHP	0,27	7,50	< 26	Très persistant
BPA	120	3,32	3250	Très persistant

Tableau 1-6 : Caractéristiques physico-chimiques [24, 46]

Toxicologie

De nos jours, ces trois molécules sont omniprésentes dans l'environnement. Les phtalates et le bisphénol A, faiblement solubles dans l'eau, sont considérés comme des substances moyennement biodégradables (les demi-vies sont de l'ordre de plusieurs jours voire plusieurs mois dans certaines conditions). De plus, leur accumulation sur les matrices solides entraîne par des phénomènes d'infiltration-ruissellement une exposition chronique de la faune et de la flore.

Le BPA est connu pour s'extraire des plastiques et les premières preuves de l'action oestrogénique, comme inhibiteur hormonal, ont été démontrées pour des concentrations comprises entre 2 et 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans des études portant sur des cellules animales et humaines. Ces effets pourraient entraîner des problèmes de santé chez l'homme, tels qu'une diminution du taux ou de la qualité des spermatozoïdes. Les valeurs de 48 h CE 50 (Concentration Efficace inhibitrice pour laquelle 50% de la population exposée est affectée par un problème identifié durant une période donnée) pour les invertébrés et pour les poissons sont comprises entre 1100 à 3900 $\mu\text{g.L}^{-1}$ et 3000 à 7000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ respectivement [46].

Malheureusement, les études menées sur l'écotoxicité de ces molécules le sont souvent à l'aide de fortes concentrations ce qui est loin de représenter la réalité. Néanmoins, les expériences ont montré des réponses spécifiques à chaque espèce de mammifère exposée [44-49]. Il est plus important de s'intéresser aux valeurs affectant des modifications au niveau des systèmes hormonaux et non aux valeurs de LE 50, par exemple le DBP produit un effet sur la reproduction des *daphnia* à partir d'une exposition de l'ordre de 0,64 mg.L^{-1} . Peu d'études ont montré en profondeur les effets de chaque phtalate sur le système hormonal, en outre les auteurs sont unanimes à dire qu'ils agissent tous en synergie.

3. Devenir dans l'environnement

Les substances organiques peuvent avoir deux origines, soient naturelles (par exemple les phytoestrogènes), soient anthropiques (par exemple les phtalates). Elles atteignent l'environnement, entrent en contact avec l'eau, l'air ou les sols et peuvent se propager sur de longues distances (plusieurs milliers de km). Il est donc important de s'intéresser aux sources d'émission mais aussi aux moyens de propagation.

REACH s'intéresse aux substances d'origine anthropique pouvant contaminer l'environnement de la population. Dans un premier temps, nous nous sommes donc intéressés aux stations d'épuration qui reçoivent chaque jour les eaux usées des populations, entraînant les substances chimiques dans l'environnement par des rejets traités partiellement, effluents et boues résiduelles, puis, dans un deuxième temps, aux eaux de rivières, de ruissellement et souterraines et à différents types de sols et de poussières. Ce paragraphe vise à décrire les traitements auxquels sont soumis les polluants recherchés et de présenter les matrices que nous avons étudiées.

3.1. Stations d'EPuration (STEP)

L'épuration des eaux usées est un ensemble de techniques qui consistent à dépolluer et à purifier suffisamment l'eau pour qu'elle n'altère pas la qualité du milieu naturel dans lequel les effluents seront finalement rejetés [50]. Les STEP sont installées généralement à l'extrémité d'un réseau de collecte juste en amont de la sortie des eaux rejetées vers le milieu naturel. De l'arrivée à la STEP jusqu'au rejet, chaque dispositif est conçu pour extraire au fur et à mesure les différents polluants contenus dans les eaux.

3.1.1. Traitements de l'eau dans une station d'épuration

Les traitements peuvent être divisés en 3 étapes. L'étape dite primaire, permet d'éliminer une grande partie des solides en suspension sous forme de boues dites « primaires », ce procédé est anaérobie. L'étape dite secondaire permet d'éliminer le reste des substances organiques en présence d'oxygène par procédé aérobie. Puis le traitement tertiaire termine le travail d'épuration et consiste en une étape de filtration et de désinfection de l'eau avant de la rejeter dans le milieu naturel.

Voici en détail les étapes de traitements (figure 1-11).

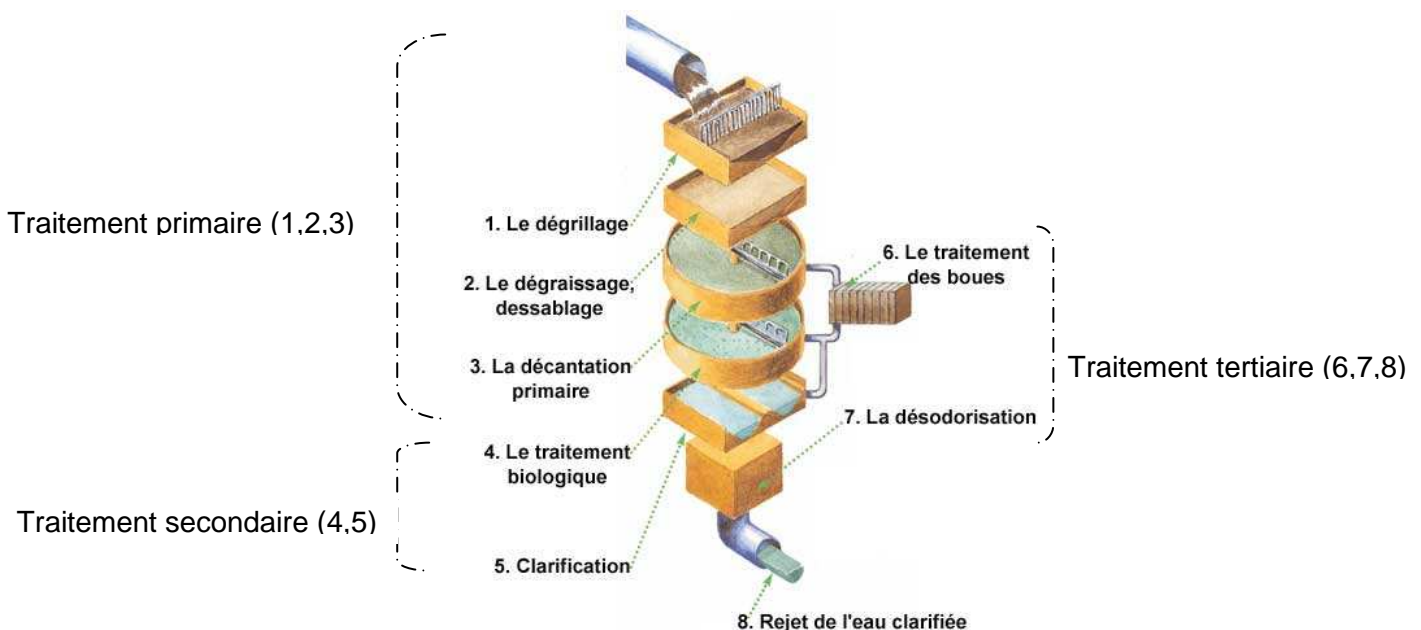


Figure 1-11 : Les différents traitements réalisés dans une station d'épuration [51]

3.1.1.1. Le traitement primaire [50]

Les prétraitements

Les dispositifs de prétraitement sont présents dans toutes les stations d'épuration. Ils ont pour but d'éliminer les éléments solides ou particulaires les plus grossiers, susceptibles de gêner les traitements ultérieurs ou d'endommager les équipements : déchets volumineux (dégrillage), sables (dessablage) et corps gras (dégraissage – déshuilage).

a) Le dégrillage consiste à faire passer les eaux usées au travers d'une grille dont les barreaux, plus ou moins espacés, retiennent les éléments les plus grossiers. Après nettoyage des grilles par des moyens mécaniques qui peuvent être manuels ou automatiques, les déchets sont évacués avec les ordures ménagères. Le tamisage, qui utilise des grilles de plus faible espacement, peut parfois compléter cette phase du prétraitement.

b) Le dessablage et le déshuilage-dégraissage consistent ensuite à faire passer l'eau dans des bassins où la réduction de vitesse d'écoulement fait se déposer les sables et flotter les graisses. L'injection des microbulles d'air permet d'accélérer la flottation des graisses. Les sables sont récupérés par pompage alors que les graisses sont raclées en surface. On enlève ainsi de l'eau les éléments grossiers et les sables de dimension supérieure à 200 microns ainsi que 80 à 90 % des graisses et matières flottantes.

Les traitements primaires et physico-chimiques

Après les prétraitements, il reste dans l'eau une charge polluante dissoute et des matières en suspension. Les traitements primaires ne portent que sur les matières particulaires décantables, tandis que les traitements physico-chimiques permettent d'agglomérer ces particules par adjonction d'agents coagulants et floculants (sels de fer ou d'alumine, chaux...). Les amas de particules ainsi formés, ou "flocs", peuvent être séparés de l'eau par décantation ou par flottation.

3.1.1.2. Le traitement secondaire [50]

Les traitements biologiques

Ces traitements sont indispensables pour extraire des eaux usées les polluants dissous, essentiellement les matières organiques. Ils utilisent l'action de micro-organismes capables d'absorber et de consommer ces matières. La sélection naturelle des espèces et leur concentration dans un bassin permet d'accélérer et de contrôler un phénomène qui se produit communément en milieu naturel. Dans le cas des eaux usées urbaines, on favorise le développement de bactéries aérobies, c'est-à-dire, celles qui utilisent l'oxygène pour se développer. Principalement, trois différents systèmes de fonctionnement existent, le lagunage, les boues activées et les biofiltres.

a) Les procédés biologiques extensifs : le lagunage naturel

Il s'agit d'un procédé en fort développement en France dans les petites communes rurales, en raison de sa rusticité allié à des performances d'épuration honorables. Le procédé de lagunage convient moins bien aux communes de populations plus importantes en raison de surfaces de bassin très importantes dans ce cas (emprise au sol : 15 m²/habitant). En effet, les lagunes sont constituées de plans d'eau peu profonds, en général au nombre de trois. L'apport d'oxygène naturel, par échange avec l'atmosphère ou par photosynthèse des algues de surface, peut être complété exceptionnellement par des aérateurs pour stimuler l'activité biologique et diminuer les surfaces.

Les lagunes présentent donc l'inconvénient d'occuper des surfaces très importantes et d'avoir des performances très variables en fonction des conditions climatiques. Par contre, elles sont rustiques et peu coûteuses en fonctionnement, et peuvent s'intégrer plus harmonieusement dans le paysage que des structures en béton.

b) Les procédés biologiques à cultures libres : les « boues activées »

Dans ces procédés, les bactéries se développent dans des bassins alimentés d'une part, en eaux usées à traiter et d'autre part en oxygène par des apports d'air. Les bactéries, en suspension dans l'eau des bassins, sont donc en contact permanent avec les matières polluantes dont elles se nourrissent et avec l'oxygène nécessaire à l'assimilation de celles-ci.

Les principes de fonctionnement diffèrent suivant que l'objectif est de traiter le carbone et/ou l'azote et/ou le phosphore. En pratique, il s'agit de permettre la sélection des espèces de bactéries capables soit de transformer le carbone en CO₂, soit de transformer l'azote en nitrates puis les nitrates en azote gazeux (N₂), soit de stocker le phosphore. Dans tous les cas, la séparation de l'eau traitée et de la masse des bactéries (que l'on appelle « boues ») se fait dans un ouvrage spécifique appelé « clarificateur ».

Pour conserver un stock constant et suffisant de bactéries dans le bassin de boues activées, une grande partie des boues extraites du clarificateur est renvoyée dans le bassin. Une petite partie de ces boues, correspondant à l'augmentation du stock pendant une période donnée, est évacuée du circuit des bassins d'aération et dirigée vers les unités de traitement des boues : cette fraction des boues constitue les « boues en excès ». La plupart des stations d'épuration municipales françaises fonctionnent selon ce principe. Les procédés « boues activées » sont les plus répandus en France.

c) Les procédés biologiques à cultures fixées : les biofiltres et les lits bactériens

Le principe de ces procédés consiste à faire percoler l'eau issue du traitement primaire à travers un matériau sur lequel se développent les bactéries qui constituent alors un biofilm. Le type de matériau varie suivant les procédés. Les lits bactériens utilisent des galets ou des supports alvéolaires, les biofiltres utilisent des matériaux de plus petite taille : des argiles cuites, des schistes, du polystyrène, des graviers ou des sables. Les biofiltres permettent généralement des traitements plus intensifs et plus poussés que les lits bactériens classiques, ils sont également plus rustiques dans leur conception et dans leur exploitation. L'avantage des biofiltres est de pouvoir traiter les matières polluantes carbonées et éventuellement azotées, dans un volume beaucoup plus faible que dans le cas de

procédés à cultures libres, avec des rendements similaires. Mais les biofiltres sont plus coûteux en investissement et sont plus délicats à faire fonctionner.

La mesure des performances de chaque traitement d'épuration se base sur les teneurs en polluants des eaux usées et des eaux épurées (cf tableau 1-7), on utilise alors plusieurs indicateurs :

<ul style="list-style-type: none"> • Les matières en suspension (MES) : matières minérales ou organiques non dissoutes 	mg/l
<ul style="list-style-type: none"> • Les matières organiques présentes sous forme particulaire ou dissoute. On les mesure indirectement par : <ul style="list-style-type: none"> - la demande biochimique en oxygène (DBO) - la demande chimique en oxygène (DCO) - l'azote et le phosphore 	mg O₂/l mg O₂/l mg N/l ou mg P/l
<ul style="list-style-type: none"> • les contaminants biologiques : bactéries, virus, parasites 	nombre/ml ou npp ou nppuc (nombre le plus probable d'unités cytopathiques)

Tableau 1-7 : Mesures caractéristiques de l'efficacité du traitement secondaire [50]

3.1.1.3. *Le traitement tertiaire [50]*

Le traitement des eaux usées en station d'épuration produit une eau épurée, rejetée dans le milieu naturel, et un concentrat désigné sous le terme de « boues » ou « boues résiduelles ».

Les boues physico-chimiques sont produites dans les stations par floculation physico-chimique. Les flocculants minéraux ajoutés participent pour une part importante à la quantité de boues produites. Ces boues sont largement obtenues dans les stations d'épuration équipant les stations balnéaires ou touristiques aux fortes variations de populations sur de courtes périodes

Les boues dites primaires résultent de la simple décantation des matières en suspension contenues dans les eaux usées brutes. Elles ne sont pas stabilisées. Les stations ne traitant que la pollution particulaire sont de plus en plus rares en France, ou alors associées à des filières complémentaires de traitement.

Les boues secondaires sont formées à partir de la charge polluante en suspension utilisée par les cultures bactériennes libres ou fixées en présence d'oxygène (aération de surface ou insufflation d'air).

Dans le cas où il existe des boues primaires et des boues secondaires, elles forment des **boues « mixtes »** fraîches qui vont subir un traitement de stabilisation biologique. Dans le cas où il n'existe pas de décantation primaire (boues activées en aération prolongée, cas fréquents en France), la stabilisation aérobie se fait par séjour prolongé dans les ouvrages épuratoires. Les lagunes produisent des « **boues de lagunage** ». Ces boues s'accumulent peu à peu au fond des bassins sont curées

annuellement, ou tous les deux ans, dans la première zone d'accumulation des dépôts, et une fois tous les cinq ou dix ans pour les autres bassins.

3.2. Le devenir des polluants après traitements

Les STEP, spécialement celles traitant les effluents de zones urbaines et de zones industrielles, reçoivent un mélange complexe composé d'une large variété de polluants organiques et les traitements sont bien souvent insuffisants pour éliminer cette « charge » de pollution.

Après traitements, les STEP produisent deux types de « déchets » :

- les effluents qui sont rejetés dans le milieu naturel, rivières et fleuves, la plupart du temps,
- les boues valorisées en épandage ou enfouies en sites spécialisés.

Ces déchets peuvent donc représenter un risque de contamination lorsqu'ils entrent en contact avec l'environnement et doivent être contrôlés.

Plusieurs substances xénobiotiques, étrangères à l'organisme, ont été identifiées dans les effluents de STEP mais beaucoup d'autres sont toujours inconnues. Les travaux d'Eriksson nous indiquent que plus de 640 composés organiques xénobiotiques ont été identifiés dans les effluents [52]. Malgré les traitements effectués en STEP, ces molécules passent dans le milieu naturel à des concentrations potentiellement toxiques affectant les espèces animales et végétales, et pouvant causer des changements des écosystèmes aquatiques. Ces molécules rentrent ainsi dans le cycle de l'eau par ruissellement-infiltration et parviennent à contaminer les eaux potables et les nappes phréatiques constituant un risque de santé publique mais aussi le milieu marin (figure 1-12).

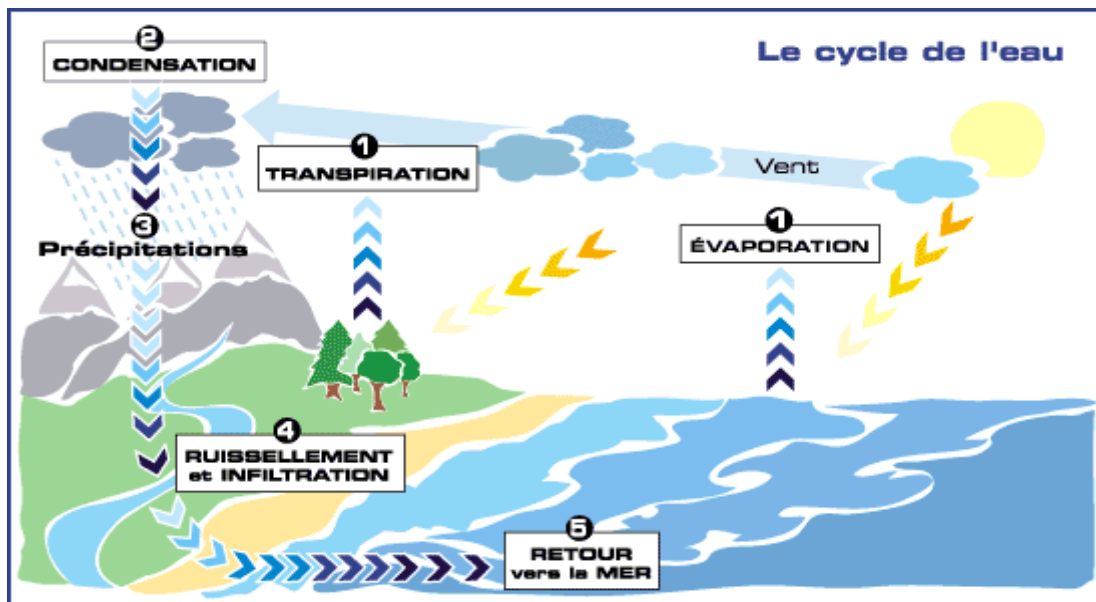


Figure 1-12 : Schéma du cycle de l'eau [53]

En outre, les matières en suspension présentes dans les effluents produisent des boues qui peuvent contenir des fortes concentrations de polluants divers. L'élimination de ces boues peut se faire de plusieurs manières dont l'épandage en champs, posant un nouveau problème de risque de

contamination des sols et des cultures. C'est pourquoi plusieurs études d'impacts propres à chaque terrain, menées par des organismes publics tels que l'INRA ou le CEMAGREF, sont conduites sur l'épandage de boues avec un suivi de la croissance de la flore ainsi que de l'évolution de la concentration de polluants sur les parcelles étudiées.

3.2.1 Devenir environnementale des pesticides

Lorsque les pesticides sont épandus dans les champs, ils subissent les conditions météorologiques et plusieurs transformations peuvent avoir lieu : adsorption, migration, transformations et dégradations. Les cinétiques de ces transformations dépendent principalement de la composition physico-chimique et bactérienne du sol, du pH, de la température et des conditions d'ensoleillement. C'est pourquoi, il est difficile de donner de manière absolue les processus qui se déroulent en conditions réelles. La majorité des pesticides sont hydrosolubles et peu volatils. Ces deux paramètres sont recherchés pour une facilité d'utilisation sous forme liquide lors des applications et pour leur durée d'efficacité. Ainsi, ces substances se retrouvent naturellement dans les eaux et les sols environnementaux. Dans les paragraphes suivant nous exposerons le devenir global pour chaque famille de pesticides choisis.

3.2.1.1. OPPs

Les OPPs sont considérés comme peu toxiques pour les êtres humains et les animaux du fait de leur rapide hydrolyse (cf § 2.1.3.1., <70 jours pour le diméthoate). Toutefois à cause de leur grande solubilité (cf § 2.1.3.1., > 20 g/L à 20 °C), on les retrouve dans les eaux de surface et les eaux souterraines. L'hydrolyse des OPPs est dépendante du pH qui modifie leurs temps de demi-vie. Ce temps est en moyenne de 10 jours en laboratoire, mais il peut augmenter jusqu'à une année à un pH de 6 et à 5°C, ce qui peut faire supposer une persistance beaucoup plus grande que celle escomptée par les études en laboratoire. De plus, les OPPs sont détectés dans les sols des années après leur application, cette persistance exceptionnelle est certainement due à leur sorption sur les particules du sol les rendant indisponibles aux microorganismes [54].

Dans notre étude, REACH s'intéresse aux substances chimiques produites et commercialisées en Europe, donc aux molécules mères des pesticides. En ce qui concerne les produits de dégradation et les métabolites des pesticides, des directives et des décisions parlementaires sont régulièrement émises en fonction des études écotoxicologiques menées par les scientifiques (cf Annexe V). A l'heure actuelle, la directive 91/414/EEC fournit les principales obligations à réaliser pour la commercialisation des produits phytosanitaires au sein de l'Union Européenne.

3.2.1.2. OCPs

Les pesticides organochlorés ont longtemps été employés pour la protection des cultures et pour le contrôle des maladies. Leur utilisation est dorénavant restreinte voire interdite pour certains d'entre eux dans les pays développés mais ils restent autorisés dans d'autres pays. C'est pourquoi, à l'aide des vents, des nuages et de la pluie, les zones d'autorisations représentent des sources potentielles de contaminations par transport des OCPs. L'interdiction d'utilisation de ces pesticides dits de

première génération (produits jusqu'en 1970), provient de leur forte bioaccumulation, notamment dans les tissus graisseux et de leur résistance aux dégradations. Néanmoins, certains produits de dégradation formés après plusieurs années dans l'environnement ont été identifiés pour le DDT comme étant le DDE et le DDD [6, 24, 54].

Pour palier à cette interdiction, des OCPs dits de deuxième génération ont été introduits, tel le méthoxychlore, beaucoup moins rémanent que le DDT et facilement métabolisé par les mammifères. Le HPTE est le principal métabolite mais il présente une toxicité estrogénique beaucoup plus active que la molécule mère [16].

3.2.1.3. Carbamates et thiocarbamates

Les carbamates et thiocarbamates représentent une alternative aux OCPs et sont largement employés pour les jardins, potagers et vergers des particuliers. En effet, ces pesticides sont peu rémanents et leur dégradation dans les sols et les eaux se fait en moyenne entre quelques jours et quelques mois au lieu de plusieurs années pour les OCPs. La dégradation des carbamates dans l'environnement s'effectue principalement par hydrolyse donnant lieu à la formation d'acide carbamique ou autres produits non toxiques, jusqu'à minéralisation complète en dioxyde de carbone et azote. Pour les thiocarbamates, les produits de dégradation principale sont le 2-imidazoldinethione (éthylènthiourée) et le propylènthiourée suspectés de provoquer des effets pathogènes (goiterogénique, carcinogénique, mutagénique, teratogène). La minéralisation complète aboutissant à la formation de disulfide de carbone [55]. Mais à cause de leur grande solubilité dans l'eau, ils migrent facilement vers les nappes phréatiques et les eaux souterraines contaminants les eaux potables.

Parmi les carbamates et thiocarbamates, certains présentent une toxicité faible (DL 50 Oral Rats > 1800 mg/kg pour le prosulfocarbe) et d'autres plus forte (DL 50 Oral Rats de 50 mg/kg pour le propoxur). Pour la plupart des pesticides de cette famille, les poissons et les oiseaux semblent beaucoup moins sensibles que les abeilles et les vers de terre [54].

En résumé, les carbamates et thiocarbamates sont moins rémanents que les OCPs tout en étant moins toxiques, même si certains ont été rapidement interdits (adldicarbe, carbofurane, DL 50 Oral Rats < 8 mg/kg) [54]. De part leur forte « consommation », plus de 25 000 tonnes produits dans le monde, ils représentent une source potentielle de polluants.

3.2.1.4. Fongicides

Les fongicides représentent un groupe de pesticides largement utilisés pour protéger les cultures des attaques des champignons (pourriture, moisissures etc ...). C'est donc naturellement qu'ils sont appliqués sur les semences dès le début de la culture. Ils peuvent donc se retrouver dans les eaux de ruissellement atteignant les rivières et les fleuves ainsi que les nappes d'eaux souterraines. A cause des effets recherchés sur toute la durée de la germination des cultures mais également durant la croissance de la plante, les fongicides sont relativement persistants, leurs temps d'hydrolyse à 20°C varient de plus de 20 jours pour le fluquinconazole jusqu'à plusieurs années pour le tébuconazole et le bromuconazole [6].

Très peu de travaux ont été réalisés sur la dégradation des fongicides, les triazoles aboutissent à la formation de 1,2,4-triazole (cf figure 1-13, DL50 comprise entre 1000 et 2000 mg/kg Oral Rats) [27], la dégradation des morpholines conduit à l'hydroxylation/oxydation des groupement méthyles portés par le noyau morpholine puis à son ouverture [56], enfin le pyridabène qui fait partie de la famille des pyridazinone est une molécule très stable dans les conditions naturelles, seule une étude en dégradation forcée à l'aide de dioxyde de titane a été réalisée [57].

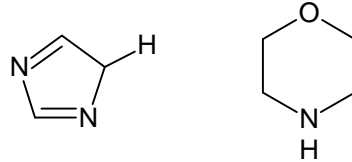


Figure 1-13 : 1,2,4 triazole, noyau morpholine

3.2.2. Devenir environnemental des PEs domestiques et industriels

3.2.2.1. Alkylphénols

La présence des APs dans les milieux aqueux dépend de leurs caractéristiques physico-chimiques et de celles du milieu dans lequel ils se trouvent. Leur structure détermine leurs processus de biodégradation et leur tendance à s'absorber sur les sédiments ou s'incorporer dans la chaîne alimentaire.

Les APnEOs atteignent l'environnement, principalement par les STEPs où ils subissent différentes transformations principalement induites par les bactéries. Les principaux métabolites des surfactants non-ioniques sont les NPs et OPs, les APs mono, di et tri-éthoxylates et alkylphénols polyéthoxylates carboxylate (APnECs) [29, 37, 58].

La dégradation bactérienne commence au niveau de la chaîne éthoxylate [39]. Puis celles-ci sont dégradées progressivement, aussi bien par coupure de la chaîne que par oxydation de l'alcool terminal donnant l'acide carboxylique correspondant [29, 37]. Ensuite, la dégradation se poursuit par la réduction de la chaîne éthoxy carboxylate [59]. Les processus de dégradation des APs sont résumés sur la figure 1-14.

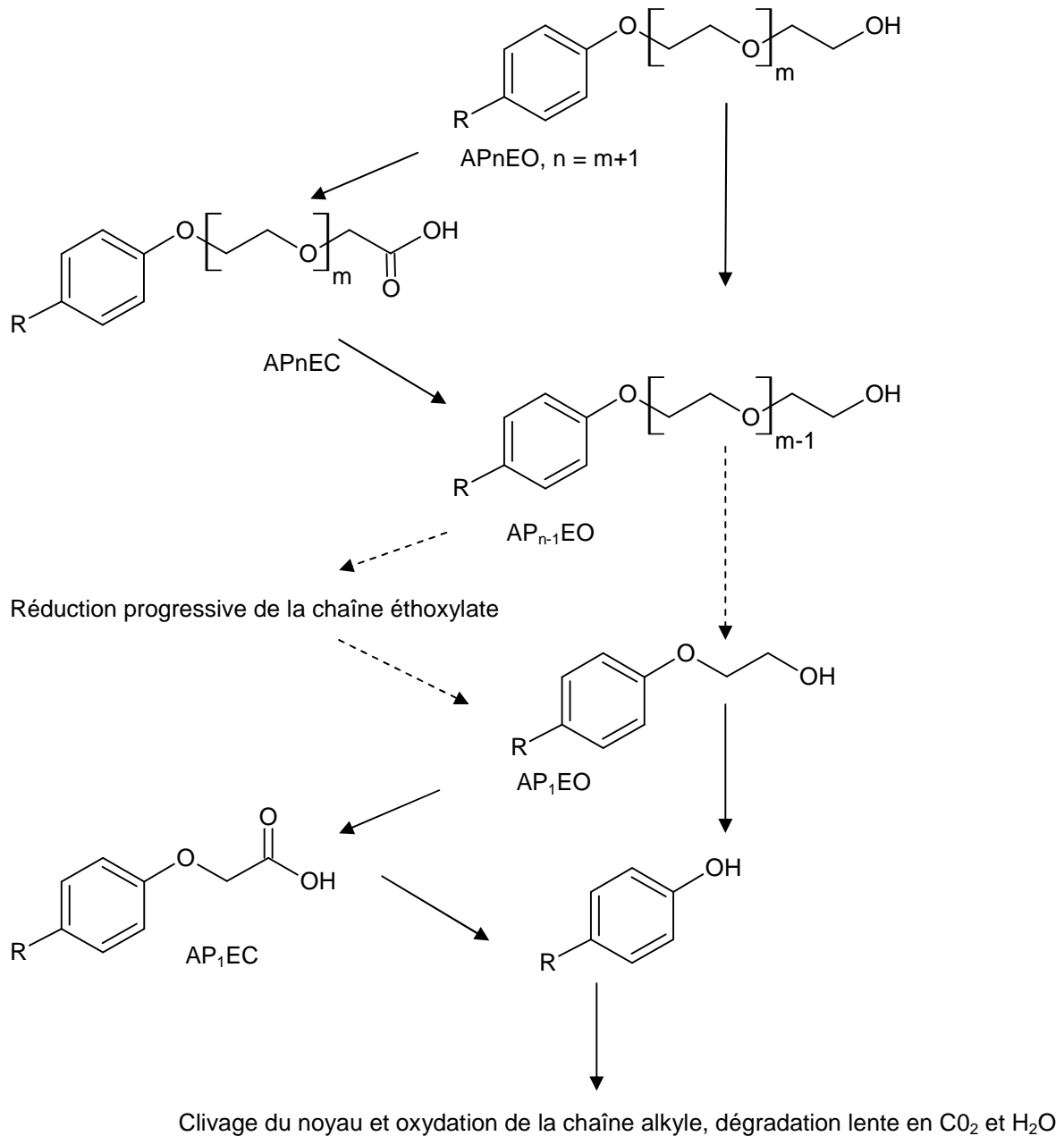
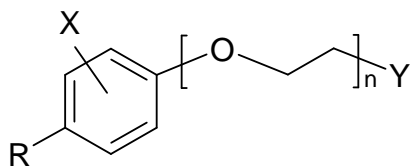


Figure 1-14 : Biodégradation des APnEOs lors du traitement aérobie/anaérobie en stations d'épuration [60-62]

Suivant les conditions du milieu de dégradation, les composés formés sont différents. En conditions anaérobies, qui est le processus de digestion des boues couramment employé dans les STEP traitant les effluents de plus de 50 000 EH (Equivalent Habitants), il se forme des APs et des AP₁EO et AP₂EO. En conditions aérobies c'est-à-dire durant le traitement secondaire, les métabolites majoritaires seront les AP₁EC et AP₂EC (figure 1-14) et APs [63]. Ces produits atteignent l'environnement aquatique via les effluents de STEP mais aussi par les rejets issus de l'application de pesticides formulés.

Les métabolites sont bien souvent plus hydrophobes que les molécules de départ et s'accumulent dans les boues et sédiments des milieux aquatiques [30]. On note également la formation de dérivés

halogénés, réaction qui se déroule durant la phase de chloration dans les stations d'épuration. L'halogène peut être du chlore ou du brome. Il se fixe de manière non spécifique sur le noyau phénolique comme indiqué sur la figure 1-15 [32].



APnEOs halogéné, Y = -OH ; n = 0 (AP) ; n = 1 (AP₁EO) ; n = 2 (AP₂EO)...

APnECs halogéné, Y = -OCH₂-COOH n = 0 (AP₁EC) ; n = 1 (AP₂EC) ...

Figure 1-15 : Métabolites halogénés

Même si ces molécules ne représenteraient que 10% de la totalité des composés alkylphénoliques, certains auteurs se sont intéressés à la toxicité de ces dérivés sur les *Daphnia magna* (invertébré zooplanctonique représentatif des écosystèmes aquatiques communément employé pour des tests écotoxicologiques standards) et ont constaté que les dérivés NPnEOs et NPnECs bromés sont plus toxiques que les composés non-halogénés [32]. Les dérivés chlorés sont peu détectés [64]. En outre, les dérivés halogénés présentent une affinité pour les récepteurs sensibles aux oestrogènes, ce qui laisse supposer un déséquilibre de la balance hormonale des organismes vivants exposés.

L'utilisation des surfactants non-ioniques à de forts tonnages, leur persistance dans les milieux naturels et leur toxicité potentielle conduisent les industriels à retirer progressivement ces composés de leurs formulations en les remplaçant par des Alcools d'Alkyl Ethoxylés (AAEs).

3.2.2.2. *Phtalates et bisphénol A*

Le BPA et les DEHP et DBP sont rejetés dans l'environnement à partir de la formulation et de l'utilisation des produits dont ils sont l'un des monomères de synthèse. Une fois dans l'environnement, et plus particulièrement dans l'eau, les phtalates ont fortement tendance à s'adsorber sur les matières en suspension et sur les sédiments. Néanmoins, plusieurs processus aident à la dispersion et la dégradation à travers les différentes matrices environnementales. Les voies d'élimination des phtalates et du bisphénol A sont principalement la biodégradation réalisée par les bactéries et la photolyse [46].

En plus de leur constante et large distribution dans l'environnement, les phtalates subissent une biodégradation lente supérieure à 30 jours [24]. La vitesse de dégradation est fonction du poids moléculaire (ceux ayant des longueurs de chaîne alkyle plus grandes se dégradant plus lentement que les autres), et des conditions de dégradation (les plus solubles se dégradant plus rapidement sous des conditions anaérobie). Ainsi, en environnement aérobie, tel que pour les boues activées, les phtalates de plus haut poids moléculaire peuvent aussi être transformés mais beaucoup moins rapidement que ceux avec des chaînes alkyles courtes. Enfin, les taux de dégradation sont dépendants de la biodisponibilité des substances. Par exemple le DEHP a un temps de demi vie de l'ordre de 58 jours en aérobie, mais une évaluation dans des conditions de biodisponibilité beaucoup plus faible a

montré une incubation supérieure à un an pour réduire la quantité de substance de seulement 40% [24]. Les voies de dégradation ont fait l'objet de nombreux travaux et tendent toutes à proposer la voie présentée sur la figure 1-16. Notons que le phtalate le plus utilisé de nos jours est le DEHP qui est aussi le plus persistant avec le DBP.

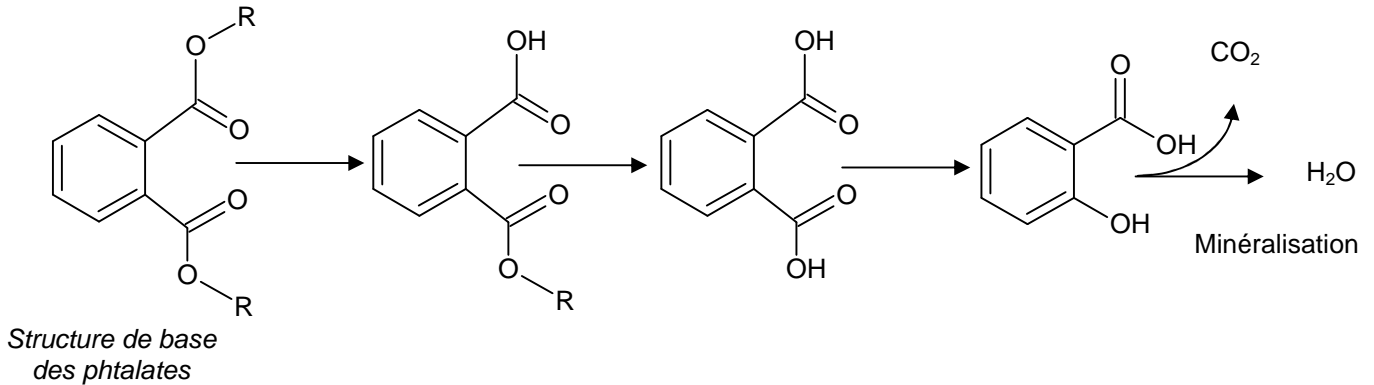


Figure 1-16 : Voie de dégradation bactérienne des phtalates [47]

En ce qui concerne le bisphénol A, des études rapportent qu'il subit une dégradation aérobie dans les 30 jours et une demi-vie de photooxydation comprise entre 66 heures et 120 jours (suivant les conditions climatiques), les principaux métabolites étant rapidement dégradés en CO₂ et eau ou incorporés dans les cellules bactériennes [48, 65].

4. Occurrence dans les matrices environnementales

Les matrices environnementales sont représentées par 3 compartiments : l'eau, le sol et l'air. Nous avons choisi de nous intéresser dans notre étude à 2 compartiments qui peuvent être directement affectés par les substances chimiques présentes sur la liste REACH : les matrices aqueuses et les matrices solides. L'air est un compartiment qui peut être un vecteur de contamination, néanmoins il n'a pas fait l'objet de travaux dans cette étude.

4.1. Matrices aqueuses

Les matrices environnementales aqueuses sont constituées généralement des eaux de surface, souterraines et traitées. C'est un milieu particulier, qui compte tenu de ses propriétés de solvation, est capable de retenir naturellement une fraction plus ou moins importante de molécules. Il permet également de véhiculer les polluants par lixiviation des matrices solides (figure 1-17), principalement par les eaux de ruissellements.

A l'heure actuelle, les enjeux environnementaux de l'Union Européenne sont menés par la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) [66] et le système REACH. Ils concernent, d'une part, la protection des milieux aquatiques, d'autre part, l'évaluation des risques des produits chimiques commerciaux dont la connaissance du devenir dans les matrices aqueuses et des effets sur la faune aquatique sont méconnus.

Pour répondre à ces enjeux, la DCE réglemente plus particulièrement la pollution des milieux aquatiques, rappelant en préambule que l'eau n'est pas un bien marchand comme les autres mais un patrimoine qu'il faut protéger et traiter comme tel. L'objectif demandé aux Etats-Membres est de parvenir à un "bon état" des eaux de surface (douces et marines) et des eaux souterraines d'ici 2015. Un second objectif, commun au règlement REACH et à la DCE, concerne la réduction de la pollution due aux substances prioritaires, et la suppression de leurs émissions, rejets et diffusions dans l'environnement. Une liste de 33 substances prioritaires (10 pesticides, 4 métaux et 19 substances organiques diverses) de la DCE a été publiée en 2001 sur la base de critères écotoxicologiques (persistant, bioaccumulable et toxique), de données sur les tonnages utilisés, des usages et des niveaux d'exposition dans l'environnement.

De par l'application de ces directives, il est donc essentiel de développer des protocoles d'analyse environnementale fiables et robustes, permettant de détecter des concentrations très faibles dans ces matrices complexes en adéquation avec les teneurs d'écotoxicité, souvent de l'ordre du ng.L^{-1} .

4.2. Matrices solides

Les matrices environnementales solides sont représentées par les sols, les sédiments et les boues issus des traitements des eaux usées. Ces matrices font partie du cycle de mobilité des polluants et peuvent représenter un véritable réservoir de substances toxiques (figure 1-17).

En effet, ces polluants présentent des affinités plus ou moins marquées pour les solides suivant leurs caractéristiques physico-chimiques, plus particulièrement à cause de leurs faibles solubilités dans l'eau et de leur forte hydrophobicité. Le coefficient de partage octanol/eau, Log Kow, est un coefficient qui permet d'évaluer l'hydrophobicité d'un composé. Une substance est dite hydrophile si son Log Kow < 3 et hydrophobe si Log Kow > 3. Ainsi, ce coefficient traduit leur facilité à s'adsorber sur les particules solides, la matière organique, les lipides, les sédiments ... Il caractérise donc également la bioaccumulation des polluants dans les tissus graisseux des organismes vivants.

De plus, certains polluants organiques ionisables et/ou ioniques peuvent se complexer avec les éléments inorganiques de la matrice, ce qui accentue la disponibilité de ces polluants prêts à être diffusés dans l'environnement [67].

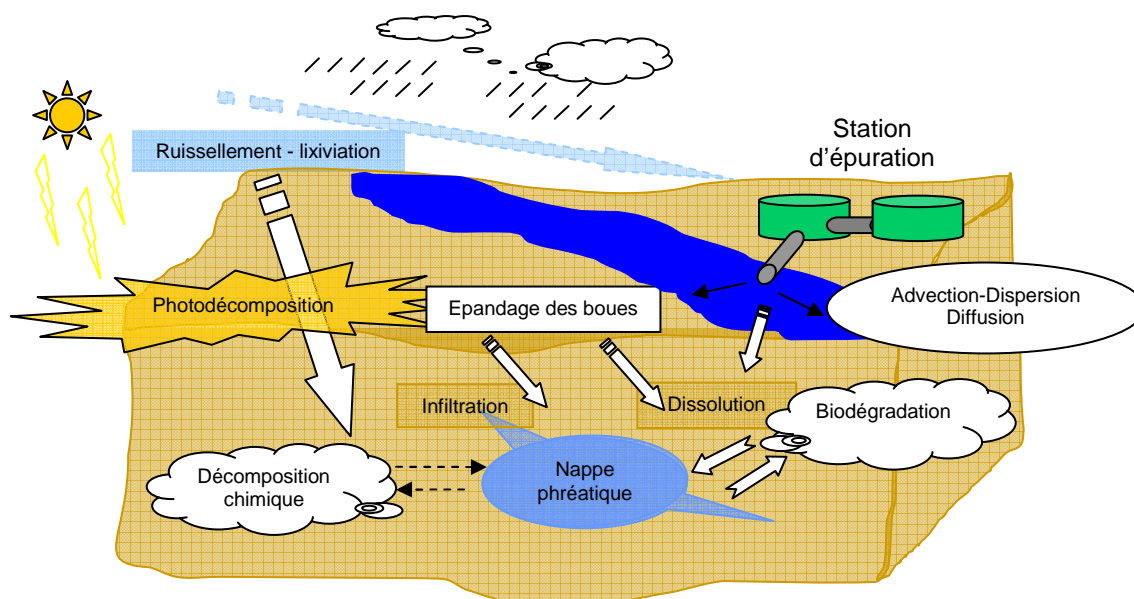


Figure 1-17 : Cycle de mobilité des polluants dans l'environnement via les stations d'épuration

Un certain nombre de travaux ont été réalisés sur les eaux [21-23, 52], beaucoup moins sur les matrices solides telles que les boues de station d'épuration qui représentent une matrice complexe comportant une grande variété de familles de composés : lipides, acides humiques, tanins, substances organiques en cours de dégradation...

Nos travaux ont d'abord portés sur les matrices les plus complexes telles les boues et les effluents de stations d'épuration pour pouvoir ensuite appliquer notre méthode d'analyse à d'autres échantillons moins complexes tels que les eaux de rivières, de puits et aux sédiments, sols...

4.3. Concentrations mesurées en pesticides

Les pesticides sont répandus sur les terrains agricoles et dans les jardins domestiques sous plusieurs formes : poudre (épandage), liquide (pulvérisation) ou solide (bâtonnets, pastilles ou enrobage de semences). Ils pénètrent donc naturellement dans l'environnement par les arrosages et par les conditions météorologiques (pluies et vents), principalement par lixiviation et ruissellements.

De nombreuses études sont réalisées sur l'analyse des pesticides dans les matrices agro-alimentaires et biologiques [14, 20, 27, 68], mais aussi sur les matrices environnementales [10-13, 15, 19, 25, 26, 69-77]. Souvent, beaucoup de méthodes analytiques ont été développées sur l'analyse des eaux et des sols, sans jamais être appliquées à la quantification des composés dans des échantillons « réels ». L'annexe VI résume des résultats non exhaustifs sur les teneurs relevées dans l'environnement par famille de molécules. Le paragraphe suivant permet d'avoir une vision globale des concentrations mesurées ainsi que des précisions sur les origines des échantillons analysés.

4.3.1. OPPs

Des méthodes analytiques pour détecter et quantifier les OPPs ont été présentées dans diverses publications [75, 78-80] et les deux composés choisis pour l'étude sont le diméthoate et le

méthamidophos, deux pesticides qui ont rarement fait l'objet de quantification dans le milieu naturel grâce à une seule méthode d'analyse.

Les résultats publiés ont montré que le diméthoate a été détecté et quantifié à des concentrations comprises entre 0,060 et 0,154 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans eaux brutes de STEP [81] et à 42 ng.L^{-1} dans les eaux de rivière [82] (Barcelone Espagne). Des études portant sur les eaux de la rivière Elbe (Allemagne) ont permis de montrer des teneurs jusqu'à 3,21 $\mu\text{g.L}^{-1}$ [83]. Ce composé a également été quantifié dans l'eau de mer/eau saumâtre à 15,99 ng.L^{-1} dans l'estuaire de la rivière Jiulong (Chine) [84], 346 ng.L^{-1} dans la baie de Meiliangwan [85] (Chine) et de 22 à 123 ng.L^{-1} dans l'estuaire de la rivière Humber (Angleterre) [80]. Plus spécifiquement, El-Kabbany a noté une concentration de 12,4 ng.L^{-1} dans un canal employé comme drain sur une parcelle cultivée en Egypte [86]. Enfin, une étude rapporte une concentration maximale de 10,90 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans des eaux souterraines (Patagonie, Chili) [87].

Le diméthoate a rarement été analysé dans les sols, les résultats connus sont : au Portugal où le pesticide a été détecté dans les sols à des concentrations comprises entre 7,1 et 95,6 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ [88] et en Egypte de 9,0 à 32,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ [86]. L'analyse de sédiments de la mer de Salton (Californie, USA) a permis de relever des concentrations comprises entre 1,3 à 2,3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ [89].

Un seul projet de recherche a fait l'objet d'une publication de résultats obtenus sur l'analyse du méthamidophos dans les eaux de l'estuaire de la rivière Jiulong (Chine), la concentration était de 46,43 ng.L^{-1} [84].

4.3.2. OCPs

Les organochlorés étant connus pour leur toxicité et leur rémanence dans l'environnement, de nombreuses études sont disponibles. Cependant, aucune n'a été réalisée sur l'analyse du HPTE dans l'environnement, métabolite principal du méthoxychlore, pesticide mis sur le marché depuis l'interdiction en 1972 du DDT dans les principaux pays développés.

Les principaux résultats ont montré que le p,p DDD était présent dans l'eau de mer (Singapour) à des concentrations comprises entre 4 pg.L^{-1} et 0,564 $\mu\text{g.L}^{-1}$ [25, 73], entre 3 et 110 pg.L^{-1} pour le p,p DDE [25] et entre 5 pg.L^{-1} et 0,808 $\mu\text{g.L}^{-1}$ [25, 73] pour le p,p DDT. Enfin, une étude nous révèle que le p,p DDE a été détecté à 5,1 ng.L^{-1} dans de l'eau utilisée comme eau potable (Espagne) [74].

Le DDT et ses produits de dégradation ont aussi été détectés dans les sédiments marins et les sols. Les concentrations retrouvées dans les sédiments marins (Singapour) sont comprises entre 6 et 7,21 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour le p,p DDD, entre 20 ng.kg^{-1} et 236,87 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour le p,p DDE et entre 50 ng.kg^{-1} et 10,95 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour le p,p DDT [11, 25]. Les concentrations dans les sols (Portugal) sont relativement proches, comprises entre 2,9 et 8,4 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour le p,p DDD et entre 7,1 et 17,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour le p,p DDE [88].

En ce qui concerne le méthoxychlore, quelques études ont donné des concentrations comprises entre 0,053 à 0,616 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans l'eau de mer (Singapour) [73] et en moyenne entre 4,07 et 29,3 ng.L^{-1} dans l'eau d'un lac artificiel dont les sédiments ont permis de détecter une concentration moyenne de 48,2 ng.kg^{-1} (Pékin, Chine) [90]. La présence de méthoxychlore dans les sédiments de la mer

Caspienne a été relevée à des teneurs comprises entre 1 ng.kg^{-1} et $1,476 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ et entre 0,17 et $0,79 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ [91]. Enfin, une dernière publication montre que des concentrations jusqu'à $0,9 \text{ ng.L}^{-1}$ ont été mesurées dans les eaux souterraines au Brésil [92].

4.3.3. Carbamates et thiocarbamates

Une publication sur le propoxur montre une concentration qui peut atteindre une valeur jusqu'à $71 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ dans les eaux souterraines en Patagonie (Argentine) [87]. L'agence Américaine de la Protection de l'Environnement (Environment Protection Agency, EPA) a analysé plus de 21000 échantillons d'eaux issus de forages pour l'adduction d'eaux potables et le pesticide a été détecté dans seulement cinq échantillons, tandis qu'il a été détecté dans 85 échantillons d'eaux de surface sur 624 prélevés et ce jusqu'à des concentrations de $0,96 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ [93]

Jusqu'à présent un seul résultat a été publié sur les concentrations environnementales en éthylèneéthiourée dans les eaux avec une teneur comprise entre 0,22 à $3,9 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ dans les eaux souterraines [94]. Aucun résultat a été publié sur la présence de cette molécule dans les sols, même si plusieurs études proposent des méthodes pour leur quantification dans ces deux matrices [18, 19, 27, 95, 96].

Enfin, le prosulfocarbe a fait l'objet d'analyse seulement dans les eaux de pluie et a été retrouvé à des teneurs comprises entre 7 à 152 ng.L^{-1} dans l'eau de pluie [97] et jusqu'à $130 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ dans les eaux de drainage évacuées lors des forts orages [98]

4.3.4. Fongicides

Les fongicides ont souvent fait l'objet d'étude dans les fruits et légumes mais rarement dans l'environnement. Deux travaux ont mis en évidence la présence de tébuconazole dans les eaux de ruissellement à hauteur de 0,05 jusqu'à $9,1 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ [99], et d'hexaconazole à $3,35 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ dans des eaux usées prélevées à côté d'une ferme agricole [100].

4.4. Concentrations mesurées en PEs

4.4.1. Alkylphénols

Sur l'ensemble des dix dernières années, les études ont montré des concentrations en NPs comprises entre $0,7 \text{ ng.L}^{-1}$ et $180 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ dans les effluents de STEP et de 5 à 180 ng.g^{-1} dans les poissons [39, 40]. Les OPnEOs et OPECs halogénés ont été détectés jusqu'à des concentrations de l'ordre de $50 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ dans les effluents de STEP [101]. En ce qui concerne les NPnEOs, on observe une distribution de molécules dont le nombre de groupements éthoxylés est inférieur à 5. Avec un $n > 5$, les NPnEOs sont absents des effluents puisqu'ils disparaissent par biodégradation rapide de la chaîne éthoxylée.

Dans les milieux aquatiques, la mobilité et le transfert de ces composés à partir des sédiments augmentent avec la présence d'acides fulviques et humiques. Ainsi les boues de stations d'épuration et les sédiments des rivières représentent des réservoirs de APs biodisponibles et permettent aux métabolites issus de la dégradation de s'accumuler progressivement dans la chaîne alimentaire aquatique [38].

4.4.2. Phtalates et Bisphénol A

Les concentrations retrouvées dans les compartiments environnementaux en Europe sont en général de l'ordre du $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour le BPA dans les effluents de STEP, et plus particulièrement entre 0,06 et 1,51 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en Espagne [31], et entre 0,018 à 0,702 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en Allemagne [45] dans les eaux de rejets et entre 0,004 à 1,363 mg.kg^{-1} [45, 102] dans les boues activées.

Les deux autres phtalates sont présents dans les effluents à des concentrations de l'ordre de 9,08 à 16,02 $\mu\text{g.L}^{-1}$ [31], de 1,74 à 182 $\mu\text{g.L}^{-1}$ [45] et de 0,5 à 1,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ [49] pour le DEHP, et dans les boues entre 27,9 et 154 mg.kg^{-1} [45, 103] pour le DBP les teneurs relevées dans les effluents de STEP varient entre 0,29 et 2,78 $\mu\text{g.L}^{-1}$ [31] et 0,2 à 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ [45] et dans les boues entre 0,2 et 2 mg.kg^{-1} [45, 103].

On peut noter la grande variation de ces valeurs qui s'explique par la grande persistance de ces molécules dans l'environnement. Leur adsorption sur les matrices solides crée de véritables « réservoirs » de phtalates prêts à être incorporés dans le cycle de l'eau lors des ruissellements ou/et infiltrations.

I.3 Extraction et analyse des substances recherchées dans les matrices complexes

La préparation de l'échantillon et l'extraction des composés à partir de la matrice originelle sont des étapes essentielles de l'analyse. Il s'agit bien souvent du point le plus délicat de tout le protocole analytique et nécessite une optimisation rigoureuse et précise, requérant l'évaluation des taux de récupération des composés à chaque étape. En effet, c'est la première étape du protocole d'analyse qui conditionne la suite des manipulations jusqu'aux résultats.

1. Techniques d'extractions

L'objectif de l'étape d'extraction est d'isoler quantitativement les composés choisis à partir d'une matrice complexe sans modification de leurs formes chimiques natives.

Ces dernières années ont vu l'apparition de nouvelles techniques d'extraction basées sur l'adsorption sélective des analytes, telles que l'extraction sur phase solide [31], sur barreau aimanté [104] ou sur fibre [29] à partir d'une matrice aqueuse ou d'un extrait organique.

Pour les matrices solides, l'objectif de l'extraction est de transférer les molécules recherchées de l'échantillon solide dans un solvant, sans perte, ni destruction. Pour cela, plusieurs techniques s'appuient sur l'augmentation du pouvoir de désorption des substances adsorbées sur la matrice solide en influant sur des paramètres tels que : la température, la pression, l'énergie électromagnétique...

Nous présenterons les différentes techniques d'extraction envisageables en appuyant notre argumentation à l'aide de tableaux proposant un résumé non exhaustif des principaux travaux dont le protocole contient l'extraction étudiée.

1.1. Extractions à partir de matrices aqueuses

1.1.1. Microextraction en phase solide (SPME)

La microextraction en phase solide ou Solid Phase MicroExtraction (SPME) est une technique d'extraction qui est employée dans l'analyse de micro-polluants présents dans les matrices environnementales [29, 73, 75, 76, 105]. Les composés sont extraits par adsorption sur une fibre de silice fondue revêtue d'un polymère. Cette technique présente l'avantage de n'employer aucun solvant, et requiert un volume d'échantillon et un temps d'absorption faible, couramment de l'ordre de la dizaine de millilitres et jusqu'à 2 heures d'exposition. Plusieurs phases sont proposées, la plus courante est le PDMS (PolyDiméthylSiloxane) mais on utilise aussi le polypropylène, le polyacrylate, le DiVinylBenzène (DVB) et le CARboxène (CAR).

Cette technique fait intervenir deux phénomènes physico-chimiques, l'adsorption des analytes sur la phase stationnaire puis leur désorption. Différents paramètres tels que le temps de contact, la force ionique de l'extrait, la température, le pH et l'agitation sont à optimiser pour obtenir une récupération maximale de chacun des composés recherchés. Néanmoins, dans le cas de la SPME, on observe un effet de matrice important créant une diminution importante des taux de récupération entre une eau Ultra-Pure (UP) dopée et une eau « réelle ». De plus, la calibration pour des analyses quantitatives

est peu aisée, il est nécessaire d'employer une calibration par étalonnage externe et/ou par ajout d'un standard interne, difficilement faisable dans le cas d'une analyse multifamilles.

Quelques travaux d'extraction par SPME des composés recherchés dans ce travail sont présentés dans le tableau 1-8.

Composés recherchés	Origine des matrices aqueuses	Echantillon (mL)	Type de phase solide	Epaisseur de polymère (μm)	Auteurs
NPnEOs BrNPnEOs	Eau de rivière et effluents de sortie de STEP, eau du robinet	30	DVB-CAR-PDMS	50	[29]
Carbamates	Eau Ultra- Pure	10	Polyacrylate	85	[105]
OCPs	Eau du robinet, eau de mer, eau de réservoir	5	Polypropylène	200	[73]
OCPs	Eau de mer	4	PDMS	100	[76]
OCPs, OPPs	Eaux souterraines	3	PDMS-DVB	60	[75]

Tableau 1-8 : Résumé des travaux comportant une étape de SPME sur des eaux environnementales

1.1.2 Extraction par adsorption sur barreau aimanté (SBSE)

L'extraction par adsorption sur barreau aimanté, Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE), est une technique de microextraction similaire à la SPME. Pour ce faire, un barreau aimanté est recouvert d'une couche de phase adsorbante, la phase commercialisée est composée de PDMS. On caractérise la phase adsorbante par le volume qu'elle occupe sur le barreau qui est bien supérieur (50 à 300 μL) à celui présent sur la fibre en SPME (0,5 μL pour une épaisseur de 100 μm).

Le barreau aimanté est plongé dans un volume d'échantillon de quelques mL à quelques dizaines de mL. Les paramètres à optimiser sont les mêmes que pour la SPME. La désorption se fait soit dans quelques mL de solvant qui sont ensuite évaporés, soit dans un système de désorption thermique.

Des travaux effectués par SBSE sur des eaux environnementales sont présentés dans le tableau 1-9.

Composés recherchés	Origine des matrices aqueuses	Volume extrait (mL)	Type de phase adsorbante	Volume de phase adsorbante (µL)	Auteurs
OPPs, OCPs, Carbamates	Eau de rivière	2	PDMS	24	[69]
OPPs, OCPs, Carbamates, Phtalates, NPs, OPs	Eau du robinet	28,5	PDMS	47	[104]
OCPs	Eau de rivière	10	PDMS	63	[106]

Tableau 1-9 Résumé des travaux comportant une étape de SBSE sur des eaux environnementales

1.1.3 Extraction sur phase solide (SPE)

L'extraction sur phase solide, Solid Phase Extraction (SPE), est certainement la technique d'extraction et de purification la plus couramment utilisée pour les matrices aqueuses ou organiques. Le but est d'isoler et de concentrer les analytes de la matrice et d'obtenir un extrait qui pourra être injecté sur un appareil analytique. La SPE a été développée pour remplacer les longues, fastidieuses et peu reproductibles méthodes d'extraction liquide-liquide. Le principe de base de la SPE est celui de la chromatographie en phase liquide. En chromatographie on freine la migration des diverses familles de molécules en les retenant sélectivement sur un adsorbant, en SPE on bloque ces mêmes molécules sur cet adsorbant puis on les élue sélectivement par un solvant spécifique.

Les adsorbants utilisés sont de diverses natures, les plus répandus sont à base de silice greffée. La nature du type de greffage détermine le mode d'interaction mis en œuvre. Ainsi un greffage C-18 sera apolaire et retiendra les diverses molécules uniquement par interactions de type Van Der Waals. Les interactions secondaires dues aux silanols libres de la silice sont malgré tout à prendre en compte dans le comportement général de l'adsorbant. Pour minimiser ces interactions secondaires on a souvent recours au « End Capping », appelé en français protection des bouts de chaînes et qui bloque une partie des OH libres à la surface de la silice par une substitution de l'hydrogène par un $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$. Ces dernières années, de nouvelles cartouches de type polymère sont apparues sur le marché. Les résines utilisées, souvent à base de Styrène Divinyl Benzène, offrent un plus large spectre d'adsorption en terme de polarité, en contrepartie elles peuvent retenir également beaucoup plus d'interférents. Ainsi la SPE permet de nombreuses combinaisons d'interactions (hydrophobes, hydrophiles, ioniques, polaires et apolaires) suivant les phases employées et le mode d'élution choisi (phases normale/inverse).

Le tableau 1-10 présente les SPE effectuées sur des eaux environnementales par différents auteurs. On remarque que pour une majorité d'entre eux ; la phase solide la plus employée a été une silice greffée C-18 convenant à une large gamme de composés de polarités variées.

Composés recherchés	Type de matrice aqueuse	Volume extrait (mL)	Type de phase solide	Quantité de phase solide (mg)	Auteurs
APs	Eau d'estuaire	1000	C-18 (Bondesil Varian)	1000	[30]
APs, BPA	Eau de surface	500	C-18 (Lichrolut RP-18 Merck)	500	[31]
	Effluents de STEP	100			
	Effluents de sortie de STEP	200			
APs	Eau potable	500	C-18 (Accubond Agilent)	500	[32]
APs	Eau de rivière	100	C-18 (Lichrolut RP-18 Merck)	500	[59]
APs	Effluents de sortie de STEP	1000	Polymère (HLB Oasis)	400	[60]
APs, Phtalates, BPA	Effluents de STEP	500	C-18 (Lichrolut RP-18 Merck)	500	[49]
OCPs	Eau souterraine	1000	C-18 (NI)	500	[10]
OPPs, OCPs, NPs, BPA	Eau souterraine	200	Polymère (HLB Oasis)	60	[13]
OCPs, OPPs, carbamates	Eau d'étang	3000	C-18 (J&W)	1000	[77]
OCPs	Eau potable	1000	C-18 (Sep-pak Waters)	1000	[74]
Fongicides	Eau souterraine et de surface	10000	Charbon graphite Carbo-pack B Supelco	500	[71]
		1000	C-18 (NI)	1000	
Carbamates	Eau de surface	100	C-18 (BonElut Varian)	1000	[107]
Carbamates	Eau potable, eau de surface	50	C-18 (LC-18 Supelco)	250	[70]

Tableau 1-10 : Résumé des travaux comportant une étape de SPE sur des eaux environnementales, NI Non Indiqué

C'est cette méthode d'extraction que nous avons sélectionnée pour sa polyvalence, sa grande flexibilité d'emploi et sa facilité de mise en œuvre pour des échantillons aqueux.

1.2. Extractions à partir de matrices solides

1.2.1 Soxhlet

L'extraction au soxhlet est une technique d'extraction solide/liquide employant une pièce de verrerie qui permet le passage du solvant sous forme liquide condensé sur une cartouche contenant le solide à extraire. L'éluat s'écoule dans le ballon contenant le solvant qui s'enrichit progressivement en composés solubles. Le cycle condensation-reflux peut durer indéfiniment mais ce procédé présente le désavantage de provoquer la dégradation des composés thermolabiles. Cette technique est devenue obsolète surtout par sa durée d'extraction et l'emploi de grand volume de solvant mais elle reste néanmoins une technique d'extraction redoutablement efficace. Plusieurs auteurs ont présenté des travaux dont la méthodologie analytique repose sur une extraction par soxhlet des nonylphénols [59] et des phtalates [103, 108, 109] ou des pesticides [110-112]

Composés recherchés	Type de matrice solide	Quantité extraite	Solvant employé	Durée	Auteurs
NPs et NPnEOs	Sédiments marins	5 à 25 g	250 mL méthanol	12h	[59]
Phtalates et NPs	Boue de STEP + sols	0,75 g de boue 25 g de sol	150 mL hexane/acétone, 1/1	24h	[103]
Phtalates	Boue de STEP	20 g	100 mL hexane/dichlorométhane, 1/1	24h	[109]
OCPs	Sédiments marins	1 g	100 mL hexane/acétone, 1/1	24h	[112]
OCPs	Sédiments marins	10 à 20 g	250 mL hexane/dichlorométhane, 1/1	8h	[111]

Tableau 1-11 : Résumé des travaux comportant une étape d'extraction par soxhlet

Des techniques plus modernes telles que l'emploi de micro-ondes ou d'un extracteur par solvant sous pression et à chaud permettent un contrôle plus aisé des récupérations des composés à extraire et un gain de temps appréciable [72].

1.2.2. Micro-ondes

Contrairement aux techniques classiques de chauffage par conduction ou convection, l'utilisation des micro-ondes implique une interaction directe entre un rayonnement électromagnétique et la matière. Le chauffage par micro-ondes d'un produit résulte de la conversion en chaleur de l'énergie d'une onde électromagnétique au sein de l'échantillon, ce transfert d'énergie induisant un transfert de matière. L'efficacité (rendement ou cinétique d'extraction) et la sélectivité (pureté des produits récupérés) des procédés d'extraction assistée par micro-ondes sont liées aux conditions particulières de transfert de matière et d'énergie. Les durées des procédés d'extraction assistée par micro-ondes sont de l'ordre de quelques minutes. Les rendements, dans la plupart des cas, sont comparables à ceux obtenus par

les procédés traditionnels d'extraction mais pour des temps d'extraction plus courts que par la méthode au soxhlet [59, 102, 112]. Lorsque les rendements sont inférieurs, il s'agit le plus souvent d'une manifestation de la sélectivité du procédé, conduisant à une plus grande pureté des extraits obtenus [30, 58, 59].

Composés recherchés	Type de matrice solide	Quantité extraite	Solvant employé	Durée - Puissance	Auteurs
OPPs	Sols	1 g	hexane	17 min à 250/300/600W	[113]
OCPs	Sédiments	1 g	eau	NI 600W	[73]
Carbamates	Sols	2 g	méthanol	6 min à 1200W	[114]
NPs, OPs et BA	Sédiments	5 g	acétone/n-hexane, 1/1	15 min à 600W	[47]

Tableau 1-12 : Résumé des travaux comportant une extraction par micro-ondes, NI, Non Indiqué

1.2.3. Extraction sous pression et à chaud

L'extraction ASE (Accelerated Solvant Extraction) ou PLE pour Pressurized Liquid Extraction est une technique de préparation d'échantillon récente qui utilise des températures et des pressions élevées (40 à 200°C – 30 à 200 bars) car ces paramètres physiques améliorent les échanges solvant-échantillon solide et augmentent la solubilité des analytes. Ils perturbent également les équilibres de surface et entraînent une baisse de la viscosité du solvant permettant une meilleure pénétration entre les particules de la matrice, les interactions soluté-matrice sont alors facilitées [115].

Le procédé consiste à remplir une cellule en acier inox par un mélange compacté d'échantillon solide et de terre de diatomée. Cette cellule d'extraction est placée dans un four et est ensuite préchauffée pendant quelques minutes (figure 1-18). Puis le solvant remplit la cellule provoquant l'augmentation de la pression. Pendant cette étape l'échantillon est extrait de façon statique. Ensuite, une purge permet de chasser l'extrait obtenu dans un flacon de récupération. Le volume récupéré dépend essentiellement du nombre de cycles d'extraction et de la taille de la cellule employée, il est au maximum de 40 mL.

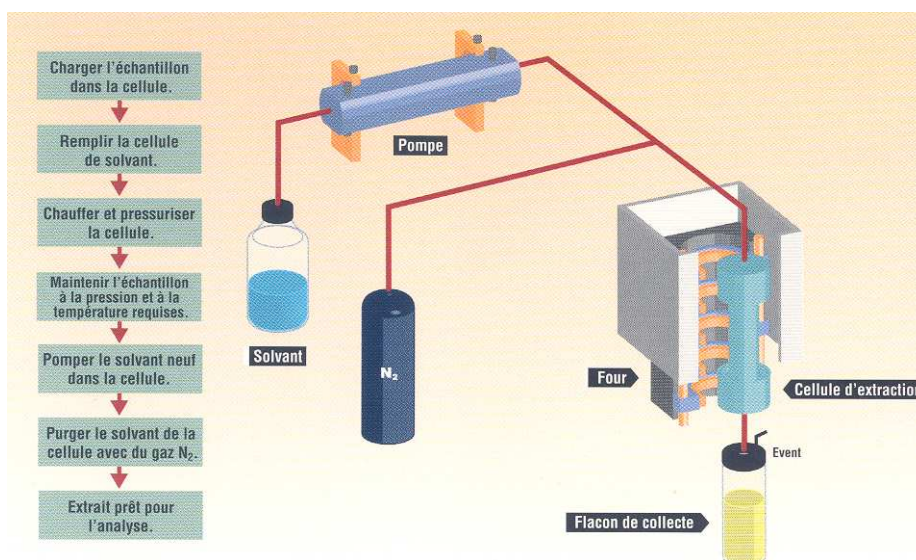


Figure 1-18 : Schéma d'un extracteur sous pression et à chaud (Source : Dionex S.A.)

Composés recherchés	Type de matrice solide	Quantité extraite	Solvant employé	Température – Pression – Durée – Nombre de cycles	Auteurs
APs et NPNs	Boue de STEP	2 g	acétone/méthanol, 1/1	50°C – 100 bars – 5 min – 2 cycles	[31]
APs et APnEOs	Boue de STEP	5 g	acétone/hexane, 1/1	60°C – 35 bars – 5 min – 2 cycles	[72]
APs et APnEOs	Sédiments de rivière	5 g	acétone/méthanol, 1/1	50°C – 100 bars – 5 min – 2 cycles	[116]
OCPs	Sols	1 g	acétone/hexane, 1/1	100°C – 140 bars – 5 min – 1 cycle	[117]
OCPs	Sols	4 g	acétone/n-heptane, 1/1	100°C – 100 bars – 5 à 8 min – 3 cycles	[118]

Tableau 1-13 : Résumé des travaux comportant une étape de PLE

Le principal problème de l'extraction à chaud sous pression est le manque de sélectivité vis-à-vis du couple analytes-matrice. Durant l'étape d'extraction, plusieurs interférents peuvent être coextraits avec les molécules d'intérêts tels que les lipides, les molécules soufrées, les tanins, les substances humiques, le cholestérol et ses dérivés... Néanmoins, cette méthode d'extraction a retenu notre attention et nous avons établi un plan d'expériences afin d'obtenir les paramètres optima pour les 33 substances analysées.

2. Techniques de séparation

2.1. Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

La CPG est une méthode de séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage. La nécessité de maintenir les molécules à l'état gazeux implique donc que toute l'opération chromatographique se réalise à une température compatible avec cet état sans provoquer leur décomposition.

De nombreuses molécules peuvent ainsi être séparées directement. Une étape de dérivation peut être nécessaire lorsqu'elles sont thermolabiles ou peu volatiles.

Le processus de chromatographie est discontinu et s'établit par une suite continue d'équilibres s'établissant entre une phase mobile gazeuse et une phase stationnaire. En CPG, il n'y a que des interactions du soluté avec la phase stationnaire, ce qui rend la méthode moins complexe qu'en chromatographie liquide mais en diminue quelque peu les possibilités.

A l'instant initial, l'échantillon est injecté en tête de colonne (quelques μL) à l'aide d'une microsiringue. Les constituants du mélange sont élués par le gaz vecteur (gaz inerte tel l'hélium). La polarité de la phase stationnaire conduira à des interactions avec les analytes. Ils seront séparés en fonction de leur polarité si la phase stationnaire est polaire, de leur volatilité si cette dernière est apolaire. Leurs différences de propriétés physico-chimiques leur confèrent des vitesses d'élution différentes et ils sont donc séparés en fonction du temps.

De nombreux travaux sur les pesticides proposant des méthodes d'analyse employant la CPG [12, 15, 20, 25, 69, 75, 76, 105] ont montré que cette technique est bien adaptée à leur séparation chromatographique en phase gazeuse.

2.2. Chromatographie en Phase Liquide (CPL)

La CPL est une autre technique de séparation qui est basée sur des interactions entre la phase stationnaire, la phase mobile et les solutés. L'échantillon est injecté dans une phase mobile liquide en contact avec la phase stationnaire contenue dans une colonne de géométrie variable.

Il s'agit d'une technique qui permet de combler les limitations de la CPG à l'analyse de certaines substances telles que :

- les substances peu volatiles,
- les composés sensibles à une élévation, même modérée, de la température,
- les molécules ionisées (car elles sont en général très peu volatiles).

En plus la CPL présentent des avantages par rapport à la CPG tels que :

- des interactions plus nombreuses entre la phase stationnaire, phase mobile et solutés,
- des possibilités de compositions de phase stationnaire beaucoup plus variées qu'en CPG.

Parmi les molécules auxquelles nous nous intéressons, certaines d'entre elles comme les carbamates et les fongicides, ne permettent pas leur séparation par CPG, la CPL est alors une technique vers laquelle nous nous sommes tournés et qui semble, d'après les travaux portant sur cette technique, bien adaptée.

Ceci nous a orienté vers une combinaison des deux techniques compte tenu de la large gamme de polarité, de composition moléculaire et de caractéristiques physico-chimiques des 33 substances recherchées.

3. Systèmes de détection

Les systèmes de détection couplés aux chromatographes sont variés et chacun possède des sensibilités spécifiques. Seul le spectromètre de masse offre une détection universelle pour une majorité de molécules, c'est un outil puissant qui présente une grande sensibilité et une spécificité élevée.

3.1. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse consiste dans une première étape à produire en phase gazeuse des ions de la molécule recherchée. On obtient le spectre de masse de la molécule, m/z en fonction de l'intensité, avec m la masse et z la charge portée par l'ion ou le fragment.

La composition d'un spectromètre de masse est la suivante :

- une source d'ionisation permettant le passage en phase gazeuse de l'échantillon mais également l'ionisation des molécules,
- un analyseur permettant de séparer les ions en fonction de leur rapport m/z ,
- un détecteur transformant l'impact des ions en signal électrique.

3.1.1. Sources d'ionisation

Ionisation par impact électronique (IE)

Jusque dans les années 90, la seule source d'ionisation employée était uniquement représentée par l'impact électronique, représentée sur la figure 1-19. Il s'agit du mode d'ionisation que nous avons utilisé en couplage CPG-SM.

La différence de potentiel apporte une certaine énergie cinétique aux électrons accélérés. Si cette énergie cinétique est suffisante, la collision entre un électron et une molécule de l'échantillon permet d'arracher un électron à la molécule. La perte de cet électron produit un cation radicalaire $M^{+\bullet}$. Pour avoir l'ionisation la plus élevée, les électrons sont accélérés avec une énergie de 70 eV. Cependant, même avec cette énergie, seulement une molécule sur 100000 est transformée. L'énergie cinétique apportée augmente l'énergie interne de l'ion moléculaire $M^{+\bullet}$, l'instabilité qui en résulte est responsable de la fragmentation de l'ion moléculaire et produit des ions fragments.

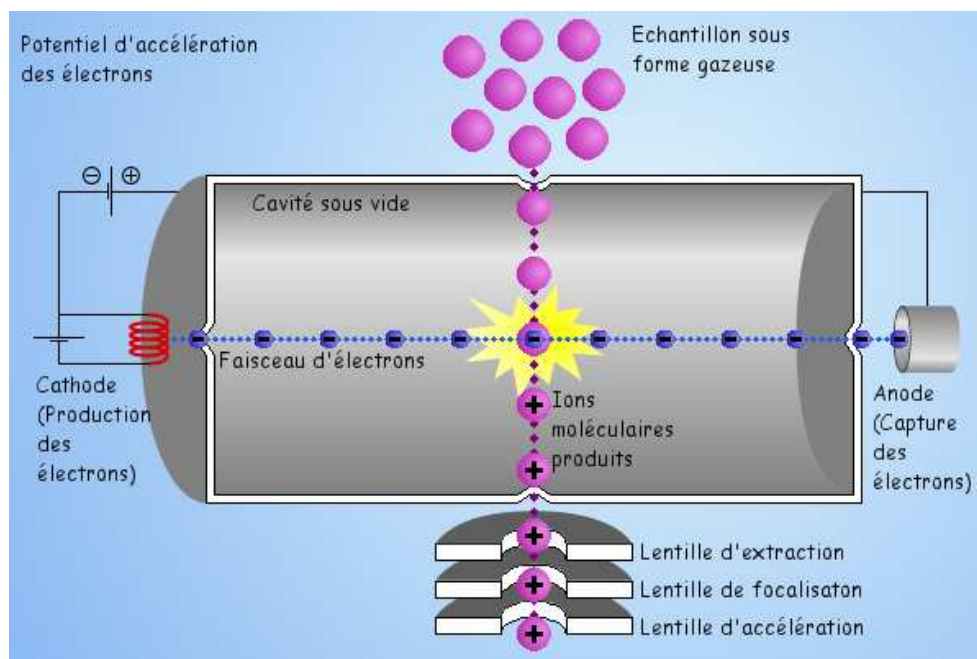


Figure 1-19 : Structure d'une source à ionisation à Impact Electronique (IE) [119]

L'avantage de ce type de source est l'obtention d'une fragmentation importante permettant l'identification des spectres à partir d'une bibliothèque commerciale ou interne au laboratoire.

Les défauts principaux sont le faible rendement d'ionisation, du fait de la faible pression de l'échantillon peu de molécules subissent un impact électronique, et l'utilisation d'un échantillon sous forme gazeuse ne permettant pas son utilisation en couplage direct avec la CPL.

Ionisation chimique (IC)

Le deuxième type de source est celui par ionisation chimique (figure 1-20), qui consiste à produire des ions par collision de la molécule à ioniser avec des ions primaires présents dans la source. On cherche donc à provoquer des collisions ions-molécules dans une partie délimitée de la source. Pour réaliser cela, on introduit donc dans la source un gaz réactif, facilement ionisable tels que le méthane, l'isobutane ou l'ammoniac. Ici encore l'échantillon doit être introduit sous forme gazeuse.

Les avantages de cette ionisation est la production d'un plus grand nombre de collisions entre les électrons et les molécules du gaz, la pression du gaz étant plus élevée que celle des molécules de l'échantillon gazeux, le rendement de l'ionisation est donc plus important qu'avec l'ionisation électronique. De plus l'ionisation chimique est une technique d'ionisation beaucoup plus douce que l'ionisation électronique et produit donc moins de fragmentations, l'interprétation des spectres est alors plus aisée.

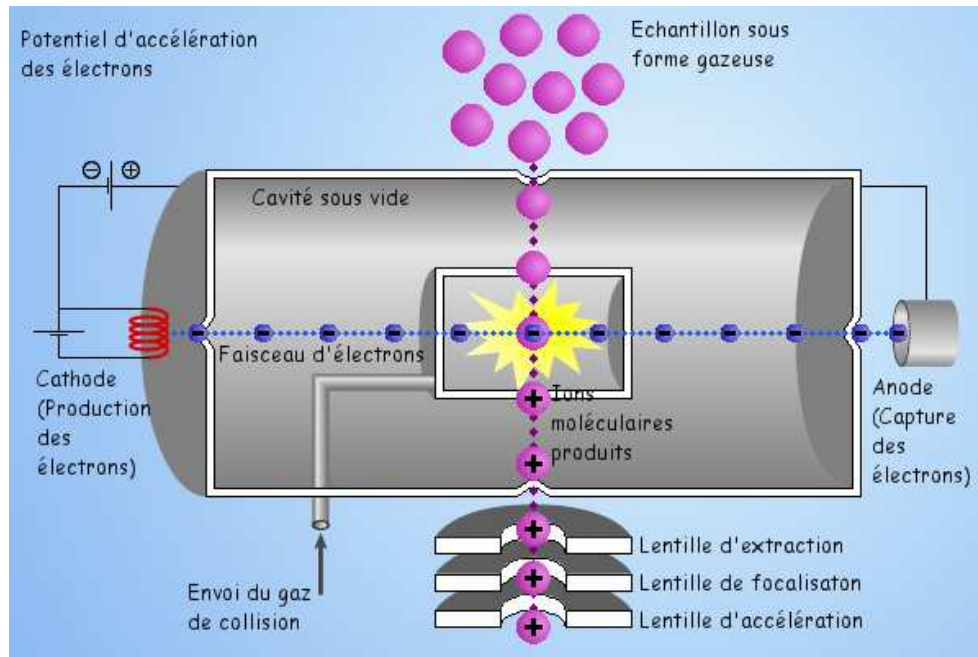


Figure 1-20 : Structure d'une source à ionisation Chimique (IC) [119]

Source électrospray (ES)

Il faut donc utiliser un autre système afin de pouvoir coupler la CPL et la spectrométrie de masse, ceci est réalisé à l'aide d'une source dite électrospray. Elle est composée d'un capillaire, par lequel est introduit l'échantillon en solution, ainsi que d'un ensemble de lentilles à l'interface entre la pression atmosphérique et l'analyseur de masse. La première lentille constitue une contre-électrode, les autres sont des écrémeurs.

Un brouillard de gouttelettes est formé à l'extrémité d'un fin capillaire de silice (figure 1-21), métallisé en surface et porté à un potentiel élevé, positif ou négatif, formant un cône de Taylor. Le champ électrique intense confère aux gouttelettes une densité de charge élevée. Par action d'un gaz sec, elles diminuent progressivement de taille en perdant des molécules de solvant par des mécanismes complexes de désolvatation et d'évaporation dans le cône de nébulisation. Jusqu'à ce que la force de répulsion des charges en surface soit supérieure à la force de cohésion. Leur densité de charge devenant trop grande, elles subissent alors une explosion coulombienne produisant des gouttelettes plus petites, puis le phénomène se poursuit jusqu'à la formation d'un ion entièrement désolvaté non fragmenté et protoné (ou cationisé).

Ce processus se déroulant à pression atmosphérique est favorisé par un rideau de gaz (azote) chauffé et à contre-courant. Ce rideau est placé devant un orifice derrière lequel se trouve l'enceinte sous vide du spectromètre de masse.

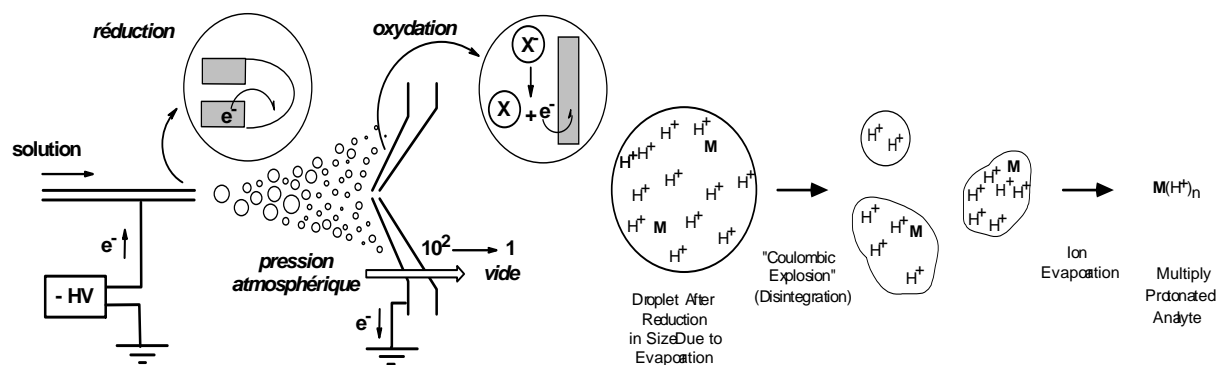


Figure 1-21 : Structure d'une source ElectroSpray (ES) [120]

L'ensemble des lentilles permet de favoriser la formation d'ions et de faire l'interface entre la pression élevée (pression atmosphérique) et la faible pression régnant dans l'analyseur (de l'ordre de 10^{-6} torr).

Source à ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI)

Dans la mesure où l'efficacité de l'ionisation chimique est reliée directement à la fréquence de collision des espèces réactives, le développement de sources à ionisation chimique à pression atmosphérique apparaît tout naturel, (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation, APCI).

Les échantillons liquides sont introduits de la même manière qu'en électrospray par un capillaire non soumis à une tension électrique. Ils subissent la désolvatation et sont ensuite ionisés chimiquement à pression atmosphérique : en général, la phase mobile vaporisée joue le rôle de gaz d'ionisation et les électrons sont obtenus à partir de décharges d'électrode couronne, dite décharge Corona. L'APCI est une technique analogue à l'ionisation chimique, elle fait appel à des réactions ions-molécules en phase gazeuse, mais à pression atmosphérique et conduit essentiellement à la formation d'ions $[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$.

Beaucoup de travaux ont rapporté des résultats sur l'analyse des OCPs [13, 25, 73] et des phtalates en CPG-IE/SM, nous mènerons notre travail sur ce système de couplage. L'étude des travaux précédents sur l'analyse des OPPs [82], des carbamates [26, 107], des fongicides [27, 68] et des APs [31, 32, 36, 58-61] nous orientent vers la CPL-ES-MS ou CPL-ES-SM-SM

3.1.2. Les analyseurs

Les qualités principales d'un analyseur sont la plage de masses analysables, la transmission et la résolution. La limite de la plage de masses analysables détermine la valeur limite du rapport m/z mesurable. La transmission est le rapport entre le nombre d'ions arrivant au détecteur et celui produit dans la source.

Le pouvoir de résolution est sa capacité à fournir des signaux permettant de distinguer deux ions de masses voisines. Il existe actuellement trois grandes configurations d'analyseur : le quadripôle, la trappe ionique et l'analyseur à temps de vol.

Le quadripôle

Le quadripôle est un système qui utilise la stabilité des trajectoires pour séparer les ions selon leur m/z en fonction d'un champ électrique, combinaison d'une tension continue et d'une tension alternative. Il est constitué de quatre barres (figure 1-22) portées à des potentiels tantôt négatifs tantôt positifs permettant le changement de direction et la focalisation de l'ion analysé.

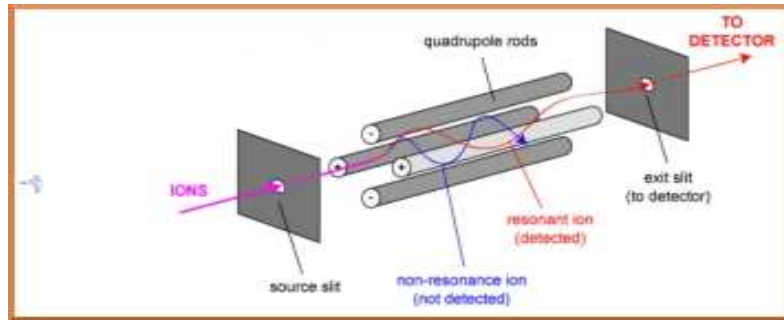


Figure 1-22 : Structure d'un analyseur quadripolaire [121]

Les principaux avantages du spectromètre quadripolaire résident dans sa souplesse d'utilisation, sa résolution unitaire sur toute sa gamme de masse qui simplifie l'interprétation des spectres, sa vitesse de balayage satisfaisante, ainsi que son adaptabilité à différentes interfaces permettant le couplage avec la CPL et la CPG.

La trappe ionique

Cette technique consiste à produire des ions directement dans un piège que l'on peut voir conceptuellement comme un quadripôle circulaire (figure 1-23). Il s'agit d'un piège ionique où l'analyse et la détection des ions s'effectuent dans un même espace. Le piège est constitué de trois électrodes à section hyperbolique : une électrode annulaire encadrée par deux électrodes (d'entrée et de sortie) qui forment les calottes supérieure et inférieure du dispositif. Une tension alternative combinée ou non à une tension continue est appliquée entre l'électrode centrale et les deux électrodes calottes. Le champ résultant est alors tridimensionnel. La trajectoire des ions est modifiée par un changement de radiofréquence. La trajectoire radiale (r) reste stable à l'inverse de la trajectoire (z). Un balayage de l'amplitude de la radiofréquence entraînera donc l'expulsion des ions piégés selon cet axe, vers le détecteur.

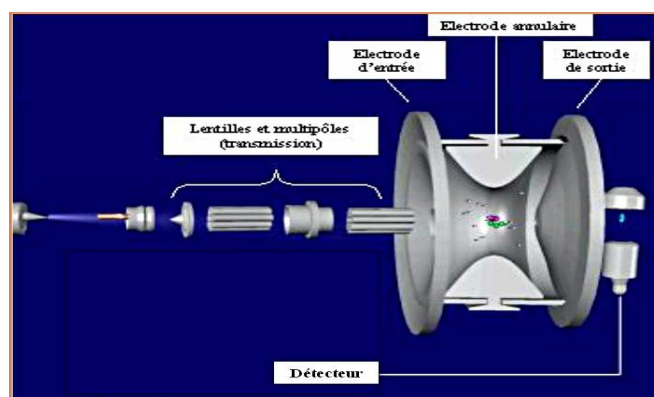


Figure 1-23 : Schéma de la structure d'une trappe et de la trajectoire des ions [121]

L'analyseur à temps de vol

L'analyseur à temps de vol est basé sur la mesure du temps que met un ion, soumis à une tension accélératrice préalable, à parcourir une distance donnée, figure 1-24.

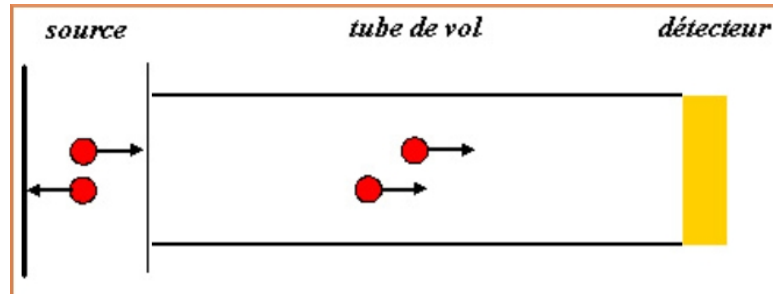


Figure 1-24 : Structure d'un analyseur à temps de vol [121]

Le rapport masse sur charge est directement mesurable à partir du temps de vol, plus précisément à partir de son énergie cinétique. Les ions accélérés pénètrent dans le tube de vol, libre de tout champ. La séparation des ions ne va donc dépendre que de la vitesse acquise lors de la phase d'accélération. Les ions de rapport m/z le plus petit parviendront au détecteur les premiers. Pour chaque groupe d'ions de même rapport m/z , un signal est enregistré au niveau du détecteur sous la forme d'une fonction temps/intensité.

Ce mode de détection comporte cependant certaines limitations en terme de résolution : ainsi deux ions identiques, de même vitesse initiale, mais localisés à deux points différents, entreront dans le tube de vol à des vitesses et des temps différents. Celui qui est à l'origine le plus loin du détecteur sera accéléré plus longtemps et aura donc un temps de vol plus court, d'où une dispersion en temps et en énergie.

Le mode réflectron permet de pallier ce phénomène. En mode réflectron, un miroir électrostatique impose un champ électrique de direction opposée à celle du champ accélérateur initial, et donc du mouvement des ions, figure 1-25.

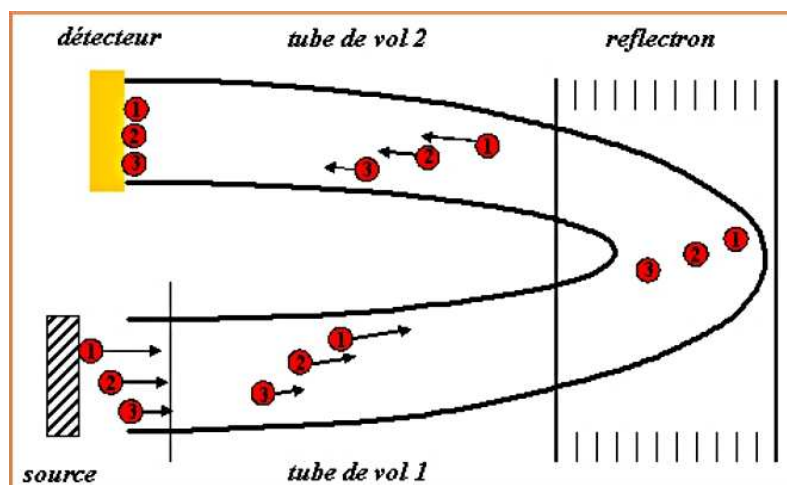


Figure 1-25 : Structure d'un analyseur en mode réflectron [121]

Ces derniers voient ainsi leur trajectoire modifiée : ils pénètrent dans le réflectron et en ressortent avec une vitesse longitudinale de sens opposé à leur vitesse initiale. Les ions les plus énergétiques arrivent les premiers au niveau du réflectron et vont y pénétrer plus profondément, ils seront donc réfléchis dans un temps plus long. De cette façon, tous les ions de même rapport m/z se trouvent focalisés sur un même plan, le détecteur du réflectron étant placé sur le plan de focalisation de ces ions. En outre, le réflectron permet d'allonger la distance de vol sans pour autant augmenter la taille de l'analyseur : les ions mettent plus de temps pour atteindre le détecteur, et réduisent aussi leur dispersion en temps, la résolution s'en trouve donc améliorée.

3.2. Spectrométrie de masse en tandem

La spectrométrie de masse en tandem est le résultat de la combinaison de deux analyseurs en série, le deuxième analyseur permettant alors d'étudier la fragmentation des ions sélectionnés par le premier. Elle peut être réalisée à l'aide de nombreux systèmes combinant les analyseurs détaillés précédemment.

Celui sur lequel nous avons travaillé résulte de l'association de deux analyseurs quadripolaires en série, séparés par une cellule de collision constituée d'un quadripôle plus court, il s'agit d'un triple quadripôle (cf figure 1-26).

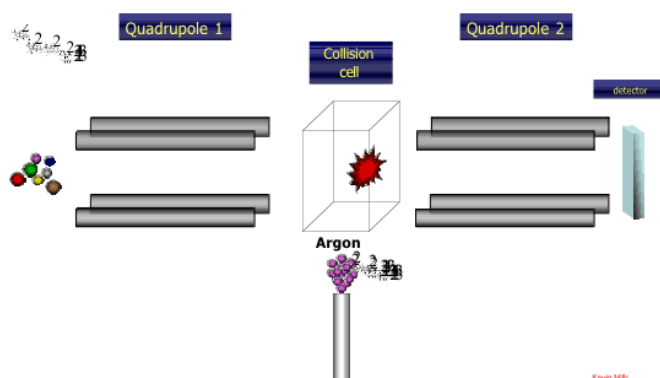


Figure 1-26 : Structure d'un triple quadripôle [122]

Cette combinaison de quadripôles permet de travailler en fragmentation simple (SM) ou en tandem. Pour réaliser une acquisition en SM, il suffit de n'appliquer qu'une tension alternative à l'un des analyseurs pour le rendre « transparent » comme la cellule de collision, celle-ci ne contenant alors pas de gaz. Lors d'une acquisition en SM/SM, la cellule de collision est remplie d'un gaz inerte (argon par exemple) sous une pression relativement élevée (10^{-2} torr). L'énergie cinétique de l'ion sélectionné est convertie lors de ses collisions successives en énergie interne. La dissociation de l'ion se réalisera lorsque son énergie interne sera devenue supérieure à l'énergie d'activation nécessaire à la fragmentation. Cette technique de dissociation activée par collision peut être amplifiée en augmentant l'énergie cinétique des ions sélectionnés par application d'une différence de potentiel entre la source et la cellule de collision. L'analyse SM/SM peut être menée selon quatre modes différents selon l'information recherchée : le mode descendant est le plus utilisé pour obtenir des informations structurales, les deux modes (ascendant et perte de neutre) sont d'un usage plus

restreint et permettent de mettre en évidence des ions ayant des particularités communes. Le quatrième mode (Multiple Reaction Monitoring ou MRM), dérivé du mode descendant, est voué à la quantification.

- en *mode descendant*, l'ion à étudier est sélectionné en focalisant le premier analyseur sur son rapport m/z . Les fragments formés dans la cellule de collision sont séparés par le deuxième analyseur et analysés. Le spectre obtenu présente à la fois l'ion précurseur (ou ion parent) et ses ions fragments (ou ions fils).
- en *mode ascendant*, le premier analyseur balaie une gamme de masse tandis que le deuxième est focalisé sur un seul rapport m/z . Tous les ions générés en source et capables de donner un fragment de même rapport m/z seront donc détectés.
- en *mode perte de neutre*, les deux analyseurs balaient une gamme de masse simultanément et mais avec un décalage de masse constant correspondant à la perte neutre suivie. Le spectre établi présentera alors tous les ions parents capables de se fragmenter en générant un neutre de masse égale au décalage imposé.
- en *mode MRM*, l'ion parent à étudier est sélectionné par le premier analyseur et fragmenté dans la cellule de collision, comme en mode descendant. En revanche, le second analyseur est focalisé sur l'ion produit. Ce mode de fonctionnement présente une double sélectivité, au niveau des sélections de l'ion parent et de l'ion produit. En outre, les deux analyseurs étant fixées à des tensions constantes, la sensibilité de détection est améliorée par rapport à d'autres modes de balayage, faisant de la MRM un mode de choix pour la quantification.

On peut également imaginer des systèmes dits « hybrides » tels qu'un quadripôle-temps de vol offrant une combinaison des avantages des deux types d'analyseurs et assurant ainsi une meilleure sensibilité et une meilleure résolution [12].

Les analyseurs utilisés dans cette étude et couplés aux CPL et CPG sont des quadripôles, nous utiliserons donc la spectrométrie de masse quadripolaire pour détecter et quantifier les 33 substances dans les matrices environnementales.

Conclusion – Objectif final

L'objectif de cette première partie était de présenter la situation et le contexte de l'étude, le choix des molécules sélectionnées, les différents travaux déjà réalisés sur celles-ci et les moyens permettant d'atteindre les buts fixés.

Le contexte de réglementation européen sur le devenir de la santé humaine ainsi que la situation de l'environnement est devenu un point essentiel et nécessite de s'appuyer sur des techniques analytiques pointues pour connaître leur devenir et leur situation dans les compartiments environnementaux.

Par conséquent, les méthodes d'analyse recherchées doivent permettre de détecter et de quantifier à l'état de traces et d'ultra-traces 33 substances susceptibles d'être présentes à la fois dans les sols et les eaux.

Le travail à effectuer est basé sur les techniques telles que la CPG-SM et la CPL-SM/SM et sur des protocoles d'extraction robustes et fiables qui requièrent d'être optimisés et évalués. Les résultats des travaux antérieurs, dont il est fait objet dans cette partie, nous orientent vers une préparation de l'échantillon avec une étape d'extraction et de préconcentration par SPE pour les matrices aqueuses et par ASE pour les matrices solides. Ensuite, les techniques analytiques nécessaires pour l'analyse multirésiduelle devront être choisies pour leur sélectivité et leur sensibilité vis-à-vis de chaque composé.

Références bibliographiques du chapitre I

1. Chemical Abstract Service. 2008. Disponible à partir de <http://www.cas.org/cgi-bin/cas/regreport.pl>
2. Margossian, N. (2007). Le règlement REACH - La réglementation Européenne sur les produits chimiques.
3. Petry, T., Knowles, R., and Meads, R. (2006). An analysis of the proposed REACH regulation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 44, 24-32.
4. Parlement Européen, (18 décembre 2006), Regulation No 1907/2006 of the European Parliament and the council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. Regulation No 1907/2006
5. Agence de l'ONU pour l'environnement, (2001), Convention de Stockholm sur les Polluants Organiques Persistants.
6. British Crop Protection Council (2003). The Pesticide Manual, BCPC, Alton.
7. Commission Européenne. 2007. Disponible à partir de <http://ec.europa.eu/>
8. Farag, A., El-Aswad, A., and Shaaban, N. (2007). Assessment of reproductive toxicity of orally administered technical dimethoate in male mice. *Reproductive Toxicology*, 23, 232-238.
9. Vala Radgnarsdottir, K. (2000). Environmental fate and toxicology of organophosphate pesticides : Environmental geochemistry and health. *Journal of the Geological Society*, 157, 859-876.
10. Shukla, G., Kumar, A., Bhanti, M., Joseph, P. E., Taneja, A., and Sarkar, A. (2006). Organochlorine pesticides contamination of ground water in the city of Hyderabad. *Environmental International*, 32, 244-247.
11. Wafo, E., Sarrazin, L., Dian, C., Schembri, T., Lagadec, V., and Monod, J.-L. (2006). Polychlorinated biphenyls and DDT residues distribution in sediments of Cortiou (Marseille, France). *Marine Pollution Bulletin*, 52, 104-120.
12. Helaleh, M., Al-Omair, A., Ahmed, N., and Gevao, B. (2005). Quantitative determination of organochlorine pesticides in sewage sludges using Soxhlet, Soxtec, and pressurized liquid extractions and ion trap mass-mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382, 1127-1134.
13. Hildebrandt, A., Lacorte, S., and Barcelo, D. (2007). Assessment of priority pesticides, degradation products, and pesticides adjuvants in groundwaters and top soils from agricultural areas of the Ebro river basin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 1459-1468.
14. Campoy, C., Jimenez, M., Olea-Serrano, M. F., Moreno-Frias, M., Canabate, F., Olea, N., Bayes, R., and Molina-Font, J. A. (2001). Analysis of organochlorine pesticides in human milk : preliminary results. *early Human Development*, 65, 183-190.
15. Cruz, S., Lino, C., and Silveria, M. I. (2003). Evaluation of organochlorine pesticide residues in human serum from an urban and two rural populations in Portugal. *Science of the Total Environment*, 317, 23-35.

16. Cummings, A. (1997). Methoxychlor as a model for environmental estrogens. *Critical reviews in toxicology*, 27, 367-379.
17. Syracuse Research Corporation. 2007. Disponible à partir de <http://www.syrres.com/>
18. Szolar, O. (2007). Environmental and pharmaceutical analysis of dithiocarbamates. *Analytica Chimica Acta*, 582, 191-200.
19. Xu, S. (2000) (Environmental Monitoring & Pest Management - Departement of Pesticide Regulation, Ed.), pp. 1-9, Sacramento.
20. Fustinoni, S., Campo, L., Colosio, C., and Birindelli, S. F., Vito (2005). Application of gas chromatography-mass spectrometry for the determination of urinary ethylenethiourea in humans. *Journal of Chromatography A*, 814, 251-258.
21. Lopez de Alda, M., Diaz-Cruz, S., Petrovic, M., and Barcelo, D. (2003). Liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. *Journal of Chromatography A*, 1000, 503-526.
22. Vuillet, E., Baugros, J.-B., Flament-Waton, M.-M., and Grenier-Loustalot, M.-F. (2007). Analytical methods for the determination of selected steroid sex hormones and corticosteroids in wastewater. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 2143-2151.
23. Lopez de Alda, M., and Barcelo, D. (2003). Review of analytical methods for the determination of estrogens and progestogens in waste waters. *Frenesius Journal of Analytical Chemistry*, 371, 437-447.
24. Metzler, M. (2001). The handbook of Environmental Chemistry, Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
25. Wurl, O., Obbard, J. P., and Lam, P. K. S. (2006). Distribution of organochlorine compounds in the sea-surface microlayer, water column and sediment of singapore's coastal environment. *Marine Pollution Bulletin*, 52, 768-777.
26. Stout, S. J., daCunha, A. R., Picard, G. L., and Safarpour, M. M. (1996). Rapid, direct determination of imidazolinone herbicides in water at the 1 ppb level by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 2182-2186.
27. Schermerhorn, P., Golden, P., Krynitsky, A., and Leimkuehler, W. (2005). Determination of 22 triazole compounds including parent fungicides and metabolites in apples, peaches, flour, and water by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 88, 1491-1502.
28. Rudel, R., Melly, S., Geno, P., Sun, G., and Brody, J. (1998). Identification of alkylphenols and other estrogenic phenolic compounds in wastewater, septage, and groundwater on Cape Cod, Massachusetts. *Environmental Science technology*, 32, 861-869.
29. Diaz, A., Ventura, F., and Galceran, M.-T. (2002). Simultaneous determination of estrogenic short ethoxy chain nonylphenols and their acidic metabolites in water by an in-sample derivatization/solid-phase microextraction method. *Analytical Chemistry*, 74, 3869-3876.
30. Ferguson Lee, P., Iden, C., Brownawell, B., Knepper, T., and Barcelo, D. (2001). Analysis of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in environmental samples by mixed-mode high-

- performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, 938, 79-91.
31. Céspedes, R., Lacorte, S., Ginebreda, A., and Barcelo, D. (2006). Chemical monitoring and occurrence of alkylphenols, alkylphenol ethoxylates, alcohol ethoxylates, phthalates and benzothiazoles in sewage treatment plants and receiving waters along the Ter river basin (Catalonia, N.E. Spain). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385, 992-1000.
 32. Petrovic, M., Barcelo, D., Diaz, A., and Ventura, F. (2003). Low nanogram per liter determination of halogenated nonylphenols, nonylphenol carboxylates, and their non-halogenated precursors in water and sludge by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of American Society for Mass Spectrometry*, 14, 516-527.
 33. Thiele, B., Günther, K., and J, S. M. (1997). Alkylphenol ethoxylates : trace analysis and environmental behavior. *Chemistry Review*, 97, 3247-3272.
 34. Schick, M. J. (1987). Nonionic surfactants : Physical Chemistry, Dekker, Marcel, New York.
 35. Ahel, M., Schaffner, C., and Giger, W. (1996). Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment - III. Occurrence and elimination of their persistent metabolites during infiltration of river water to groundwater. *Water Research*, 30, 37-46.
 36. Pedersen, S., Christiansen, L., Pedersen, K., Korsgaard, B., Bjerregaard, P., Hutchinson, T., and Matthiessen, P. (1999). In vivo estrogenic activity of branched and linear alkylphenols in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Endocrine disruption in wildlife: identification and ecological relevance. *Science of the Total Environment*, 233, 89-96.
 37. Ying, G.-G., Williams, B., and Kookana, R. (2002). Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates - a review. *Environmental International*, 28, 215-226.
 38. Ahel, M., Mcevoy, J., and Giger, W. (1993). Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in freshwater organisms. *Environmental Pollution* 1987, 79, 243-248.
 39. Warhurst, M. A. (1995) in Friends of the Earth Scotland, University of Edinburgh, Edinburgh.
 40. Vitali, M., Ensabella, F., Stella, D., and Guidotti, M. (2004). Nonylphenols in freshwater of the hydrologic system of an Italian district : association with human activities and evaluation of human exposure. *Chemosphere*, 57, 1637-1647.
 41. McLeese, D. W., Zitko, V., Sergeant, D. B., Burridge, L., and Metcalfe, C. D. (1981). Lethality and accumulation of alkylphenols in aquatic fauna. *Chemosphere*, 10, 723-730.
 42. Wahlberg, C., Renberg, L., and Wideqvist, U. (1990). Determination of nonylphenol ethoxylates as their pentafluorobenzoates in water, sewage sludges and biota. *Chemosphere*, 20, 179-195.
 43. Argese, E., Marcomini, A., Miana, P., Bettiol, C., and Perin, G. (1994). Submitochondrial particle response to linear alkylbenzene sulfonates, nonylphenol polyethoxylates and their biodegradation derivatives. *Environmental Toxicology Chemistry*, 13, 737-742.
 44. Marquet, F., and Payan, J.-P. 2006. Disponible à partir de http://www.inrs.fr/htm/etude_passage_percutane_bisphenol-a_in_vivo_ex.html
 45. Fromme, H., Küchler, T., Otto, T., Pilz, K., Müller, J., and Wenzel, A. (2002). Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Research*, 36, 1429-1438.
 46. Staples, C., Dorn, P., Klecka, G., and O'Block, S. (1998). A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere*, 36, 2149-2173.

47. Wang, J., Liu, P., Shi, H., and Qian, Y. (1997). Kinetics of phthalic acid ester degradation by acclimated activated sludge. *Process Biochemistry*, 37, 567-571.
48. Spivack, J., Leib, T., and Lobos, J. (1994). Novel pathways for bacterial metabolism of bisphenol A. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 7323-7329.
49. Ballesteros, O., Zafra, A., Navalon, A., and Vilchez, J. L. (2006). Sensitive chromatographic-mass spectrometric method for the determination of phthalate esters, alkylphenols, bisphenol A and their chlorinated derivatives in wastewater samples. *Journal of Chromatography A*, 1121, 154-162.
50. Institut Génie de l'Environnement Ecodéveloppement (IG2E), (2006), Formation "Pollutions et Nuisances, eau et déchets".
51. Société des Eaux du Nord. 2007. Disponible à partir de <http://www.sen.fr/default.htm>
52. Eriksson, E., Auffarth, K., Henze, M., and Ledin, A. (2002). Characteristics of grey wastewater. *Urban Water* 4, 85-104.
53. 2007. Disponible à partir de <http://temps.site.voila.fr/eau.ht2.gif>
54. Colin Baird (1998). *Environmental Chemistry*, Second Edition, W. H. Freeman and Company, New York.
55. Blasco, C., Font, G., and Pico, Y. (2004). Determination of dithiocarbamates and metabolites in plants by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1028, 267-276.
56. Terence, R. (1999). *Metabolic Pathways of Agrochemicals Herbicides and Plant Growth Regulators Insecticides and Fungicides Part two*, Rpyal Society of Chemistry.
57. Zhu, X., Fenga, X., Yuana, C., Caob, X., and Lib, J. (2005). Photocatalytic degradation of pesticide pyridaben in suspension of TiO₂ : identification of intermediates and degradation pathways *Journal of Molecular Catalysis A : Chemical*, 229, 95-105.
58. Ferguson Lee, P., Iden, C., and Bronwnawell, B. (2000). Analysis of alkylphenol ethoxylate metabolites in their aquatic environment using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 72, 4322-4330.
59. Jonkers, N., Knepper, T., and De Voogt, P. (2001). Aerobic biodegradation studies of nonylphenol ethoxylates in river water using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Environmental Science Technology*, 35, 335-340.
60. Jahnke, A., Gandrass, J., and Ruck, W. (2004). Simultaneous determination of alkylphenol ethoxylates and their biotransformation products by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1035, 115-122.
61. Espejo, R., Valter, K., Simona, M., Janin, Y., and Arrizabalaga, P. (2002). Determination of nineteen 4-alkylphenol endocrine disrupters in Geneva municipal sewage wastewater. *Journal of Chromatography A*, 976, 335-343.
62. Renner, R. (1997). European bans on surfactants trigger transatlantic debate. *Environmental Science Technology*, 31, 316-320.
63. Becue, A., and Nguyen, R. (1995) (INERIS, I. N. d. I. E. i. e. d. R., Ed.).

64. Maki, H., Okamura, H., Aoyama, I., and Fujita, M. (1998). halogenation and toxicity of the biodegradation products of a nonionic surfactant, nonylphenol ethoxylate. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17, 650-654.
65. Lobos, J., Leib, T., and Su, T.-M. (1992). Biodegradation of bisphenol A and other bisphenols by a Gram-Negative aerobic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 1823-1831.
66. Parlement Européen, (23 octobre 2000), Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council establishing a framework for the Community action in the field of water policy. 2000/60/EC,
67. Water Chemical Society (2006). Organic pollutants in the water cycle - Properties, occurrence, analysis and environmental relevance of polar compounds, Reemtsma Thorsten, Jekel Martin.
68. Sannino, A., Bolzoni, L., and Bandini, M. (2004). Application of liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry to the determination of a new generation of pesticides in processed fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1036, 161-169.
69. Ochiai, N., Sasamoto, K., Kanda, H., and Nakamura, S. (2006). Fast screening of pesticides multiresidue in aqueous samples by dual stir bar sorptive extraction-thermal desorption-low thermal gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1130, 83-90.
70. Nogueira, J., Sandra, T., and Sandra, P. (2004). Multiresidue screening of neutral pesticides in water samples by high performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 505, 209-215.
71. Jeannot, R., Sabik, H., Sauvard, E., and Genin, E. (2000). Application of liquid chromatography with mass spectrometry combined with photodiode array detection and tandem mass spectrometry for monitoring pesticides in surface waters. *Journal of Chromatography A*, 879, 51-71.
72. Andreu, V., and Pico, Y. (2004). Determination of pesticides and their degradation products in soil : critical review and comparison of methods. *Trends in Analytical Chemistry*, 23, 772-789.
73. Basheer, C., Lee Kee, H., and Obbard, P. (2002). Determination of organochlorine pesticides in seawater using liquid-phase hollow fibre membrane microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 968, 191-199.
74. Fernandez, M., Garcia, C., Garcia-Villanova, R., and Gomez, J. (1996). Evaluation of liquid-solid extraction with new sorbent and liquid-liquid extraction for multiresidue pesticides. Determination in raw and finished drinking waters. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 1790-1795.
75. Gonçalves, C., and Alpendurada, M. F. (2002). Multiresidue method for the simultaneous determination of four groups of pesticides in ground and drinking waters, using solid-phase microextraction-gas chromatography with electron-capture and thermionic specific detection. *Journal of Chromatography A*, 968, 177-190.
76. Hernandez-Romero, H., Tovilla-Hernandez, C., Malo, E., and Bello-Mendoza, R. (2004). Water quality and presence of pesticides in a tropical coastal wetland in southern Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, 48, 1130-1141.

77. Lyytikäinen, M., Kukkonen, J., and Lydy, M. (2003). Analysis of pesticides in water and sediment under different storage conditions using gas chromatography. *Archive of Environmental Contamination Toxicology*, *44*, 437-444.
78. Lopez, F. J., Pitarch, E., Egea, S., Beltran, J., and Hernandez, F. (2001). Gas chromatographic determination of organochlorine and organophosphorus pesticides in human fluids using solid phase microextraction. *Analytica Chimica Acta*, *433*, 217-226.
79. Beltran, J., Lopez, F. J., and Hernandez, F. (2000). Solid-phase microextraction in pesticide residue analysis. *Journal of Chromatography A*, *885*.
80. Karamfilov, V. K., Fileman, T. W., Evans, K. M., and Mantoura, R. F. C. (1996). Determination of dimethoate and fenitrothion in estuarine samples by C- 18 solid-phase extraction and high-resolution gas-chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *Analytica chimica acta*, *335*, 51-61.
81. Quintana, J., Marti, I., and Ventura, F. (2001). Monitoring of pesticides in drinking and related waters in NE Spain with a multiresidue SPE-GC-MS method including an estimation of the uncertainty of the analytical results. *Journal of Chromatography A*, *938*, 3-13.
82. Kampioti, A., Borba da Cunha, A., Lopez de Alda, M., and Barcelo, D. (2005). Fully automated multianalyte determination of different classes of pesticides, at picogram per litre levels in water, by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *382*, 1815-1825.
83. Götz, R., Bauer, O. H., Friesel, P., and Roch, K. (1998). Organic trace determination compounds in the water of the river Elbe near Hamburg Part II. *36*, 2103-2118.
84. Zulin, Z., Huasheng, H., Jianqing, L., Weiqi, C., and Li, X. (2002). Determination and load of organophosphorus and organochlorine pesticides at water from Jiulong river estuary, China. *Marine Pollution Bulletin*, *45*, 397-402.
85. Na, T., Fang, Z., Zhanqi, G., Ming, Z., and Cheng, S. (2006). The status of pesticide residues in the drinking water sources in Meiliangwan Bay, Taihu Lake of China. *Environmental monitoring and assessment*, *123*, 351-370.
86. El-Kabbany, S., Rashed, M. M., and Zayed, M. A. (2000). Monitoring of the pesticide levels in some water supplies and agricultural land, in El-Haram, Giza (A.R.E.). *Journal of Hazardous Materials A*, *72*, 11-21.
87. Loewy, M., Kirs, V., Carvajal, G., Venturino, A., and Pechen de D'Angelo, A. (1999). Groundwater contamination by azinphos methyl in the Northern Patagonic Region (Argentina). *Science of the Total Environment*, *225*, 211-218.
88. Gonçalves, C., and Alpendurada, M. F. (2005). Assessment of pesticide contamination in soil samples from an intensive horticulture area, using ultrasonic extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, *65*, 1179-1189.
89. Sapozhnikova, Y., Bawardi, O., and Schlenk, D. (2004). Pesticides and PCBs in sediments and fish from the Salton Sea, California, USA. *Chemosphere*, *55*, 797-809.
90. Xue, N., Xu, X., and Z, J. (2005). Screening 31 endocrine-disrupting pesticides in wtare and surface sediment samples from Beijing Guanting reservoir. *Chemosphere*, *61*, 1594-1606.

91. Shegunova, P., Klanova, J., and Holoubek, I. (2007). Residues of organochlorinated pesticides in soils from the Czech Republic. *Environmental Pollution*, 146, 257-261.
92. Junior, J. L. R., and Ré-Poppi, N. (2007). Determination of organochlorine pesticides in ground water samples using solid-phase microextraction by gas chromatography-electron capture detection. *Talanta*, 72, 1833-1841.
93. United States Environment Protection Agency, P., Pesticides and Toxic Substances (1997). Reregistration Eligibility Decision (RED) Propoxur, EPA.
94. Meiring, H. D., and de Jong, A. P. J. M. (1994). Determination of ethylenethiourea in water by single-step extractive derivatization and gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 683, 157-165.
95. Frakes, R. A. (1988). Drinking water guideline for ethylenethiourea, a methabolite of ethylenebisdithiocarbamate fungicides. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 8, 207-218.
96. Hatik, S., and Tekel, J. (1996). Extraction methodology and chromatography for the determination of residual pesticides in water. *Journal of Chromatography A*, 733, 217-233.
97. Bernhardt, A., and Ruck, W. (2004). Determination of herbicides in stemflow and throughfall of beeches (*Fagus sylvatica* L.) and in rainfall. *Chemosphere*, 57, 1563-1570.
98. Neumann, M., Liess, M., and Schulz, H. (2003). A qualitative sampling method for monitoring water quality in temporary channels or point sources and its application to pesticide contamination. *Chemosphere*, 51, 509-513.
99. Berenzen, N., NLenzen-Godding, A., Probst, M., Schulz, H., Schulz, R., and Liess, M. (2005). A comparison of predicted and measured levels of runoff-related pesticides concentrations in small lowland streams on a landscape level. *Chemosphere*, 58, 683-691.
100. Pan, H.-J., and Ho, W.-H. (2004). Determination of fungicides in water using liquid phase microextraction and gas chromatography with electron capture detection. *Analytica Chimica Acta*, 527, 61-67.
101. Ball, H., Reinhard, M., and McCarty, P. (1989). Biotransformation of halogenated and nonhalogenated octylphenol polyethoxylate residues under aerobic and anaerobic conditions. *Environmental Science Technology*, 23, 951-961.
102. Gatidou, G., Thomaidis, N., Stasinakis, A., and Lekkas, T. (2007). Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1138, 32-41.
103. Gibson, R., Wang, M.-J., Padgett, E., and Beck, A. (2005). Analysis of 4-nonylphenols, phthalates, and polychlorinated biphenyls in soils and biosolids. *Chemosphere*, 61, 1336-1344.
104. Serôdio, P., and Nogueira, J. (2004). Multi-residue screening of endocrine disrupters chemicals in water samples by stir bar sorptive extraction-liquid desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta*, 517, 21-32.
105. Carabias-Martinez, R., Garcia-Hermida, U., Rodriguez-Gonzalo, E., and Ruano-Miguel, L. (2005). Behaviour of carbamate pesticides in gas chromatography and their determination

- with solid-phase extraction and solid-phase microextraction as preconcentration steps *Journal of Separation Science*, 28, 2130-2138.
106. Penalver, A., Garcia, V., Pocrull, E., Borrull, F., and Marce, R. (2003). Stir bar sorptive extraction and large volume injection gas chromatography to determine a group of endocrine disrupters in water samples. *Journal of Chromatography A*, 1007, 1-9.
 107. El Atrache, L., Sabbaha, S., and Morizurb, J. P. (2004). Identification of phenyl-N-methylcarbamates and their transformation products in Tunisian surface water by solid-phase extraction liquid chromatography–tandem mass spectrometry *Talanta*, 65, 603-612.
 108. Cai, Q.-Y., Mob, C.-H., Wu, Q.-T., Zenga, Q.-Y., and Katsoyiannis, A. (2007). Quantitative determination of organic priority pollutants in the composts of sewage sludge with rice straw by gas chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1143, 207-214.
 109. Cai, Q.-Y., Mo, C.-H., Wu, Q.-T., Zeng, Q.-Y., and Katsoyiannis, A. (2007). Occurrence of organic contaminants in sewage sludges from eleven wastewater treatment plants, China. *Chemosphere*, 68, 1751-1762.
 110. Wang, W., Meng, B., Lu, X., Liu, Y., and Tao, S. (2007). Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides from soils: A comparison between Soxhlet extraction, microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction techniques. *Analytica chimica acta*, 602, 211-222.
 111. Bakan, G., and Ariman, S. (2004). Persistent organochlorine residues in sediments along the coast of mid-Black Sea region of Turkey. *Marine Pollution Bulletin*, 48, 1031-1039.
 112. Villaverde, J., Hildebrandt, A., Martínez, E., Lacorte, S., Morillo, E., Maqueda, C., Viana, P., and Barceló, D. (2008). Priority pesticides and their degradation products in river sediments from Portugal. *Science of the Total Environment*, 390, 507-513.
 113. Fuentes, E., Baez, M. E., and Labra, R. (2007). Parameters affecting microwave-assisted extraction of organophosphorus pesticides from agricultural soil. *Journal of Chromatography A*, 1169, 40-46.
 114. Sun, L., and Kee Lee, H. (2003). Stability studies of propoxur herbicide in environmental water samples by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization ion-trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1014, 153-163.
 115. Richter, B., Jones, B., Azzell, J., and Porter, N. (1996). Accelerated Solvent Extraction : a technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, 68, 1033-1039.
 116. Petrovic, M., Lacorte, S., Viana, P., and Damia, B. (2002). Pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of alkylphenolic compounds in river sediment. *Journal of Chromatography A*, 959, 15-23.
 117. Concha-Grana, E., Turnes-Carou, M. L., Muniategui-Lorenzo, S., Lopez-Mahia, P., Fernandez-Fernandez, E., and Prada-Rodriguez, D. (2004). Development of pressurized liquid extraction and cleanup procedures for determination of organochlorine pesticides in soils. *Journal of Chromatography A*, 1047, 147-155.

118. Hussen, A., Westbom, R., Megersa, N., Mathiasson, L., and Björklund, E. (2007). Selective pressurized liquid extraction for multi-residue analysis of organochlorine pesticides in soil. *Journal of Chromatography A*, 1152, 247-253.
119. Université de Lille 1. 2006. Disponible à partir de <http://www.univ-lille1.fr/master-proteomique/proteowiki>
120. Ikonomou, M. G., Blades, A. T., and Kerbale, P. (1991). Electrospray-ion spray : a comparison of mechanisms and performance. *Analytical Chemistry*, 63, 1989-1998.
121. Wikipedia. 2008. Disponible à partir de <http://fr.wikipedia.org>
122. Institute of Child Health (ICH). 2008. Disponible à partir de http://www.ich.ucl.ac.uk/services_and_facilities/lab_services/mass_spectrometry/metabolomics/HPLC_ESI_MS.html

Chapitre II

II.1 Mise au point de la méthode d'analyse des 33 substances

1. Introduction

L'étude bibliographique donnée dans le premier chapitre nous a permis de dégager une utilisation généralisée de la CPG-SM pour l'analyse des pesticides et des phtalates. Les alkylphénols sont, quant à eux, analysés la plupart du temps en CPL-SM/SM, technique préférable à la CPG-SM. Néanmoins, nous avons donc décidé, d'une part, d'évaluer la réponse de chaque composé en CPG-SM, puis celle obtenue par CPL-SM/SM d'autre part car notre objectif est de sélectionner la technique analytique:

- la plus adaptée aux concentrations environnementales (de l'ordre du ng.L^{-1} et $\mu\text{g.kg}^{-1}$ soient de l'ordre du ppt, partie par trillion et du ppb, partie par milliard)
- la plus adaptée aux conditions du protocole de préparation et d'extraction des échantillons solides et aqueux
- la plus sélective et sensible vis-à-vis de chaque composé

Pour cela, des compromis ont dû être faits pour atteindre une méthode d'analyse multi-famille la plus juste et appropriée possible.

Bester [1] expose la procédure que nous avons choisie pour élaborer le développement de méthode d'analyse des contaminants organiques dans l'environnement car cette procédure a pour but de sélectionner la méthode analytique la plus juste pour la quantification des composés recherchés et permet de proposer la méthode d'analyse ainsi développée en tant que protocole quantitatif dans le cadre de contrôle qualité ou pour un statut de normalisation. Le processus de décision appliqué à notre projet est donné sur la figure 2-1.

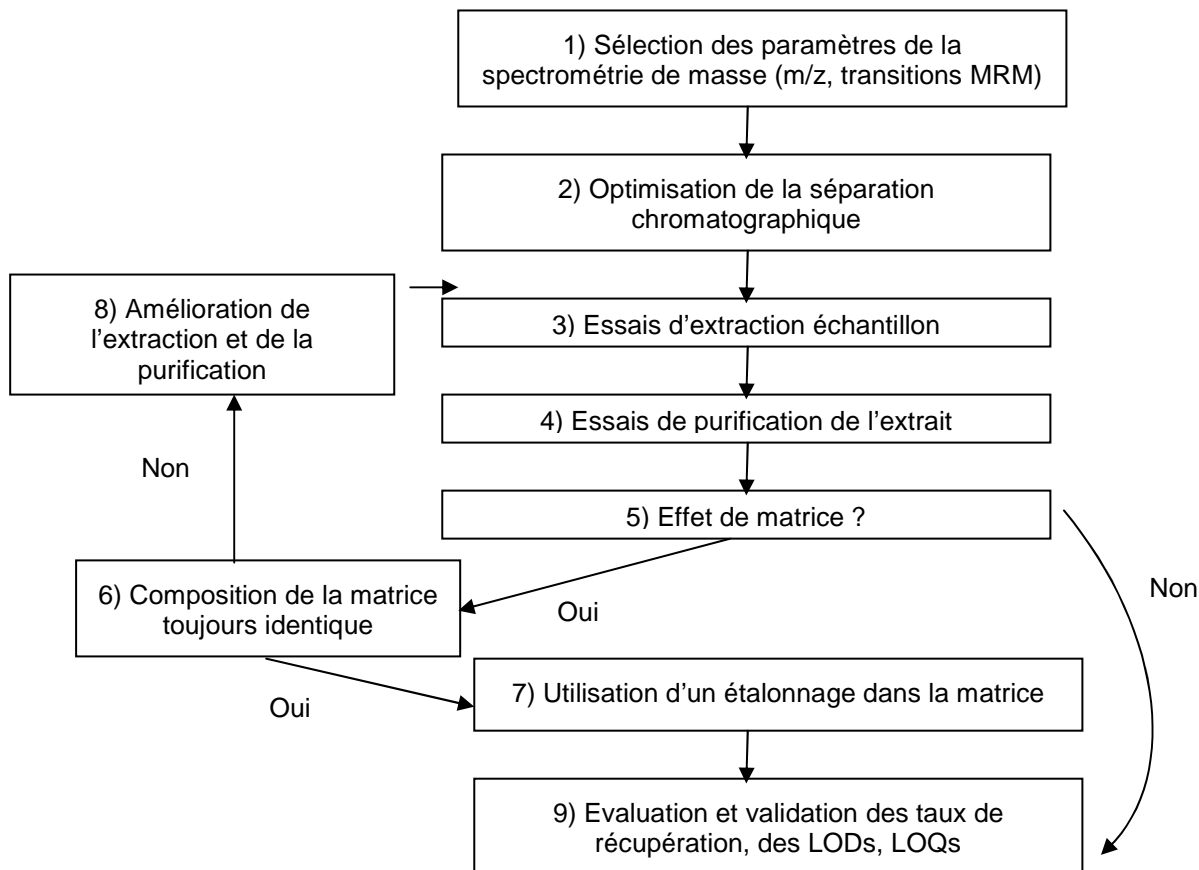


Figure 2-1 ; Arbre de décision pour le développement de méthode d'analyse environnementale [1]

Dans une première partie nous exposerons le travail de mise au point des analyses en montrant les difficultés résolues (disponibilité des références étalons, décision de la technique analytique utilisée) puis dans une deuxième partie nous présenterons l'optimisation de l'extraction des composés à partir des matrices aqueuses environnementales complexes. Enfin, nous détaillerons les résultats obtenus dans la troisième partie [2].

2. Disponibilité, choix et purification des références étalons

2.1. Choix des étalons

Pour réaliser une analyse quantitative, il est indispensable d'utiliser des produits de référence de grande pureté. Tous les composés choisis pour l'étude et employés comme étalons sont d'une pureté minimale de 97%, avec une exception pour le bromuconazole dont la pureté est de 94%. La mise au point d'une méthode analytique et surtout la quantification des molécules pose un problème lorsque celles-ci ne sont pas disponibles commercialement. Nous avons été confrontés à ce problème en particulier pour les alkylphénols éthoxylés.

Il est important de noter que les nonylphénols éthoxylés (degré d'éthoxylation non précisé) sont présents sur la liste de l'annexe XVII du système REACH (cf annexe III).

Pour rechercher ces molécules, nous devons utiliser des étalons de référence certifiés. A ce jour, il n'existe pas d'AP_nEO disponibles avec $n \geq 3$, aussi bien NP_nEO que OP_nEO. Nous avons tenté alors de procéder à une purification à partir d'un mélange commercial d'AP_nEO par chromatographie semi-préparative et par chromatographie flash.

2.2. Cas des alkylphénols éthoxylés

2.2.1. Chromatographie semi-préparative

La chromatographie préparative est une technique de purification rapide et automatisable qui nécessite le couplage de la chaîne CPL à un collecteur de fractions. La collecte des fractions a été réalisée à l'aide d'un Gilson fraction collector FC 203B connecté à une chaîne 1100 Agilent.

Au préalable, nous avons sélectionné un système « phase stationnaire-phase mobile » parmi le choix de colonnes de géométrie analytique (2,0 à 3,0 mm de diamètre interne), le but étant d'obtenir la meilleure résolution possible sur les pics des AP_nEOs à partir d'un mélange chromatographié. Une fois la colonne analytique choisie (phase stationnaire C-18 Uptisper 3HDO, 3 μ m), nous avons optimisé la composition de phase mobile qui est constituée à 76% de MeOH et de 24% d'eau UP. La détection se fait obligatoirement par un détecteur non destructif, nous avons choisi de travailler par détection UV en mesurant la variation de l'absorbance à 210 nm.

Le but de la purification est d'obtenir quelques milligrammes de AP₃EO, nous avons donc utilisé la chromatographie semi-préparative avec une colonne chromatographique de diamètre compris entre 4,6 et 22 mm. Ces différentes expériences nous permettent de purifier entre 0,1 mg et 1 g de produit.

Nous avons réalisé plusieurs injections-collections sur une colonne de dimensions appropriées (dimensions 250 * 10 mm) avec un débit de 3,0 mL.min⁻¹, en phase de polarités inversées avec un mélange eau UP / méthanol, 24/76.

Dans le cadre d'une chromatographie préparative, il est préférable de travailler en mode isocratique avec une phase mobile riche en solvant et ne comportant aucun adjuvant (ni sels, bases, acides). Le choix de travailler en mode isocratique riche en solvant organique (ici le méthanol) permet de diminuer le temps d'équilibration de la colonne entre plusieurs injections et le temps d'évaporation des fractions. L'absence d'acide ou de sels permet de ne pas les concentrer avec le produit au risque de diminuer la pureté de produit par l'apport d'impuretés provenant de l'ajout de ces adjuvants à la phase mobile. La séparation obtenue est représentée sur la figure 2-2.

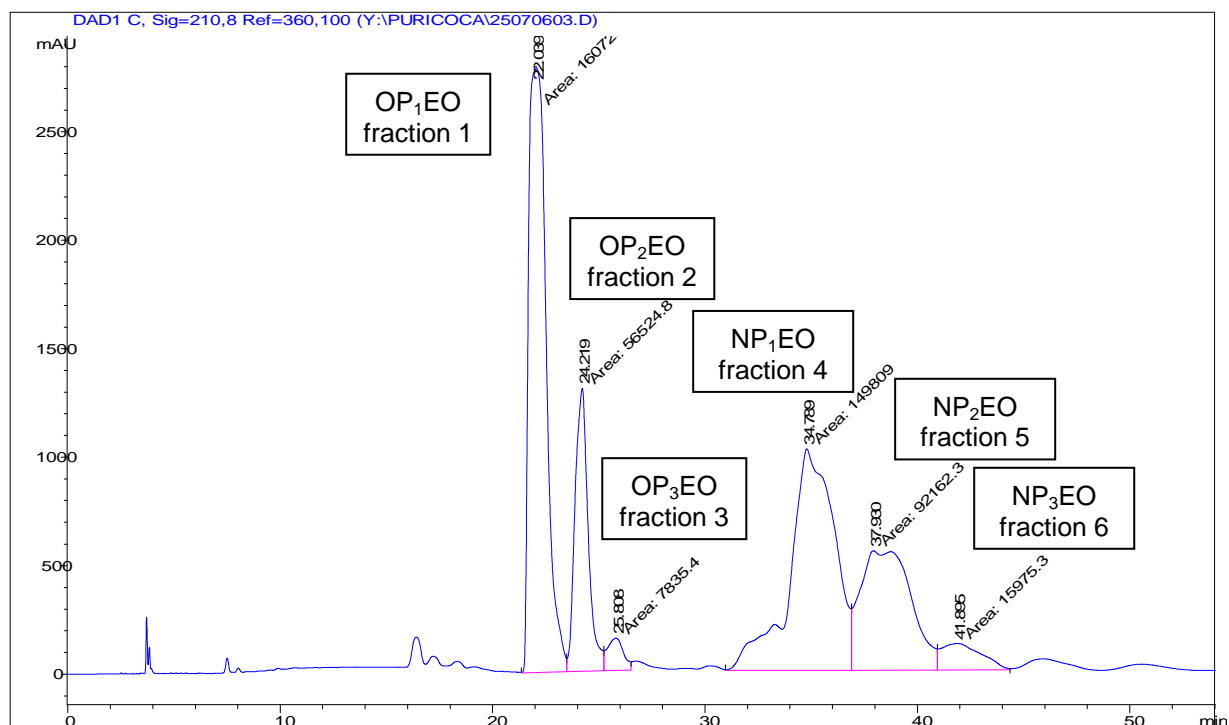


Figure 2-2 : Chromatogramme obtenu en CPL préparative sur un mélange d'OPnEOs et NPnEOs

Les fractions collectées ont été ensuite évaporées et purifiées selon les mêmes conditions une deuxième fois par chromatographie semi-préparative puis analysées par CPG-SM. Les résultats sont présentés dans le tableau 2-1.

Composés	1 ^{ère} purification	2 ^{ème} purification
NP ₁ EO	80%	94%
NP ₂ EO	38%	62%
NP ₃ EO	2%	33%
OP ₁ EO	62%	77%
OP ₂ EO	22%	34%
OP ₃ EO	1%	7%

Tableau 2-1 : Puretés des fractions collectées après chromatographie préparative analysées par CPG-SM

Les résultats obtenus compris entre 7 et 94 % n'ont pas permis une purification acceptable des APnEOs (vérifiée par CPG-SM). Ceci est certainement dû à la faible résolution obtenue entre les formes diéthoxylées et triéthoxylées qui n'est pas suffisante pour fournir des composés étalons de pureté supérieure.

2.2.2. Chromatographie flash

Nous avons aussi étudié une purification par chromatographie flash sur 60 g de gel de silice (0,060-0,200 mm 70-230 mesh) avec un conditionnement et une élution par un mélange polaire/apolaire, Acétate d'éthyle / n-Hexane (2/8 ; v/v). Les conditions opératoires et le protocole suivis sont issus du travail publié par Datta S. [3]. Avant de procéder à la chromatographie flash, nous avons vérifié par Chromatographie sur Couche Mince (CCM) la bonne sélection des solvants à utiliser. Les mélanges commerciaux, CO-210 (NPnEOs) et CA-210 (OPnEOs) sont déposés indépendamment en tête de colonne, environ 35 fractions sont collectées pour chaque mélange. La séparation des espèces éluées est suivie par chromatographie sur couche mince et par révélation sous UV à 254 nm (réactif phosphomolybdique). Ces fractions sont regroupées selon leurs rétentions relatives (Rapports frontaux, Rf), puis concentrées par évaporation du solvant. Le résidu huileux obtenu est ensuite repris dans 2 mL de méthanol et analysé par CPG. L'analyse des fractions obtenues nous a permis de déterminer leur pureté respective qui s'est avérée être inférieure à 75%.

2.2.3. Conclusions

La purification du NP₁EO serait satisfaisante, 94% de pureté mais ces derniers résultats obtenus ont montré que les deux procédures employées ne permettent pas de séparer et purifier correctement les autres formes éthoxylées pour les deux APnEOs. Les formes triéthoxylées qui ne sont pas disponibles commercialement sont malheureusement celles qui présentent les puretés les plus faibles. Notre méthode d'analyse permet donc de détecter et de quantifier les deux premiers éthoxylés des NPs et OPs, et de détecter seulement les formes triéthoxylées.

3. Choix des techniques analytiques en vue de la mise au point de la méthode d'analyse des 33 substances

Le but de notre projet est de mettre au point une méthode d'analyse multi-familles dont les différents composés sont présents à l'état de traces et ultra-traces dans des matrices environnementales complexes. Les techniques analytiques moléculaires les plus répandues en analyse environnementale sont la CPG-SM et la CPL-SM/SM. Nous avons donc décidé d'évaluer ces deux techniques et nous avons comparé leurs performances afin d'atteindre les exigences réglementaires [4, 5].

Dans un premier temps, nous avons réalisé une optimisation du système de couplage CPG-SM pour chacune des 5 familles en choisissant une phase stationnaire adaptée puis en examinant les paramètres du spectromètre de masse. Nous avons ensuite estimé les limites de détection et de

quantification pour chacune d'entre elles. Ces résultats nous ont permis de mettre en évidence les premières difficultés qu'il était possible de rencontrer pour certains composés avec cette technique.

Dans un deuxième temps, les composés difficilement séparables par CPG ont été analysés par CPL et les paramètres optimisés (phase stationnaire, phase mobile, température du four, paramètres du spectromètre de masse, concentration en sel). Nous avons pu choisir le meilleur système d'analyse pour chacun des 33 composés ciblés.

3.1. Analyse multi-résidus par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

3.1.1. Appareillage

Les analyses sont réalisées sur un appareil Agilent équipé d'un détecteur de masse 5973N, d'un chromatographe HP 6890 GC et d'un passeur d'échantillon HP 7683. La séparation chromatographique a été optimisée sur un mélange étalon de 13 pesticides (OPPs, OCPs et carbamates), puis sur un mélange des 7 fongicides, des APs et enfin des perturbateurs endocriniens industriels (Phtalates et Bisphénol A).

Nous avons choisi d'injecter en mode pulsé sans division (pulsed splitless). Ce mode d'injection a été préféré au mode direct ou avec division pour un gain de sensibilité. Nous avons testé deux types de colonnes de dimensions 30 m de longueur x 0,25 mm de diamètre interne x 0,25 µm d'épaisseur de film couramment employées pour l'analyse des familles de molécules recherchées [6-13] :

- DB-XLB, une colonne capillaire peu polaire
 - o comportant 12% de diphényle
- HP-5MS, colonne capillaire apolaire
 - o comportant seulement 5 % de greffage diphényle

Une acquisition en mode full-scan permet d'obtenir le spectre de masse en mode IE de chaque composé et de sélectionner 3 ions caractéristiques parmi les plus intenses, avec si possible l'ion moléculaire. Les ions choisis sont réunis dans la 1^{ère} colonne du tableau 2-2.

La colonne de phase stationnaire apolaire, HP-5MS, retient beaucoup moins les composés polaires et permet une analyse rapide et une résolution satisfaisante. Ceci nous permet dans toute la suite du travail de réaliser la séparation des composés sur ce type de colonne et de faire des acquisitions en mode Single Ion Monitoring (SIM) qui présente l'avantage d'augmenter la sensibilité du détecteur quadripolaire.

3.1.2. Sensibilité suivant les familles de composés

Dans un premier temps, nous avons évalué la sensibilité obtenue par CPG-SM en mode SIM pour chacun des composés en réalisant une série de 5 injections de 5 extraits d'effluents de STEP dopés à des concentrations différentes de plus en plus diluées (par exemple de 5 ppm à 0,2 ppm pour le NP₂EO et de 35 à 7 ppm pour le propoxur). Pour chacune des familles les paramètres du

chromatographe et du spectromètre de masse ont été optimisés. Ce travail nous a permis de calculer une estimation théorique des limites de détection (LD) et limites de quantification (LQ) associées à chacun des composés (tableau 2-2).

Les équations pour calculer les LD et LQ sont les suivantes :

$$LD = 3 s(b) / a \quad \text{et} \quad LQ = 10 s(b) / a$$

Équation 2-1 : Calcul d'estimation théorique des limites de détection et de quantification [14]

Avec $s(b)$, l'écart-type de l'ordonnée à l'origine et a la pente de la droite de régression.

Nous nous sommes basés sur le temps de rétention des composés et la présence simultanée de deux ions caractéristiques afin de tracer la droite d'étalonnage grâce à :

- l'ion le plus intense pour calculer la limite de quantification
- l'ion le moins intense pour calculer la limite de détection.

Le troisième ion permet d'obtenir une spécificité plus élevée en calculant les ratios d'abondance relative de chaque ion et ainsi de remplir les conditions de la décision de la Commission Européenne 2002/657 concernant la performance des méthodes d'analyse [15].

Ces estimations des limites de détection et de quantification sont rapportées à la méthode en considérant le facteur total d'enrichissement final de 1500 fois pour les matrices aqueuses (300 mL concentré à 200 μ L). Cette étape sera développée dans la partie 2 de ce travail.

Il est important de noter que les limites associées au 2-imidazolidinethione n'ont pas pu être évaluées en raison de son comportement chromatographique en phase gazeuse. Nous exposerons ce problème dans le paragraphe 3.1.4.2. Les résultats sont présentés dans le tableau 2-2, ils sont issus de l'optimisation complète que nous présentons dans la suite du chapitre.

II.1 Mise au point de la méthode d'analyse des 33 substances

Composés	m/z	LD instrumentale en ppm (<i>m/z</i>)	LQ instrumentale en ppm (<i>m/z</i>)	LD méthode en ppb	LQ méthode en ppb
Alkylphénols, phtalates et plastifiant					
NPs	135-149-220	0,76 ± 0,04 (220)	2,8 ± 0,1 (135)	0,50 ± 0,03	1,86 ± 0,09
OPs	107-135-206	1,53 ± 0,08 (206)	5,6 ± 0,3 (135)	1,02 ± 0,05	3,7 ± 0,2
NP ₁ EO	135-179-264	0,24 ± 0,01 (264)	0,54 ± 0,03 (179)	0,157 ± 0,008	0,36 ± 0,02
NP ₂ EO	135-237-279	0,21 ± 0,01 (279)	0,61 ± 0,03 (237)	0,141 ± 0,007	0,41 ± 0,02
OP ₁ EO	107-135-179	0,29 ± 0,01 (107)	0,95 ± 0,05 (179)	0,19 ± 0,01	0,64 ± 0,03
OP ₂ EO	135-223-294	0,27 ± 0,01 (294)	0,87 ± 0,04 (223)	0,181 ± 0,009	0,58 ± 0,03
DEHP	149-279-167	2,3 ± 0,1 (279)	7,8 ± 0,4 (149)	1,51 ± 0,08	5,2 ± 0,3
DBP	149-205-223	1,13 ± 0,06 (205)	5,2 ± 0,3 (149)	0,76 ± 0,04	3,5 ± 0,2
BA	119-213-228	4,7 ± 0,2 (119)	14,9 ± 0,7 (213)	3,1 ± 0,2	10,0 ± 0,5
Organophosphorés					
Diméthoate	87-93-125	2,6 ± 0,1 (125)	9,3 ± 0,5 (87)	1,72 ± 0,09	6,2 ± 0,3
Méthamidophos	94-95-141	0,92 ± 0,05 (141)	15,8 ± 0,8 (94)	0,61 ± 0,03	10,5 ± 0,5
Carbamates					
Propoxur	81-110-152	7,5 ± 0,4 (81)	25 ± 1 (110)	5,0 ± 0,3	16,5 ± 0,8
Prosulfocarbe	91-128-251	1,49 ± 0,07 (251)	4,8 ± 0,2 (91)	1,00 ± 0,05	3,2 ± 0,2
Triazoles, morpholine et pyridazinone					
Tébuconazole	163-250-252	1,16 ± 0,06 (163)	3,9 ± 0,2 (250)	0,77 ± 0,04	2,6 ± 0,1
Hexaconazole	214-216-231	1,58 ± 0,08 (231)	5,3 ± 0,3 (214)	1,05 ± 0,05	3,5 ± 0,2
Tétraconazole	254-336-338	1,24 ± 0,06 (254)	5,1 ± 0,3 (336)	0,83 ± 0,04	3,3 ± 0,2
Fluquiconazole	313-340-342	1,09 ± 0,05 (313)	3,6 ± 0,2 (340)	0,73 ± 0,04	2,4 ± 0,1
Bromuconazole	173-175-295	1,38 ± 0,07 (295)	4,3 ± 0,2 (173)	0,92 ± 0,05	2,9 ± 0,1
Diméthomorphe	301-387-389	1,06 ± 0,05 (389)	5,5 ± 0,3 (301)	0,71 ± 0,04	3,7 ± 0,2
Pyridabène	117-147-309	1,11 ± 0,06 (309)	3,6 ± 0,2 (147)	0,74 ± 0,04	2,4 ± 0,1
Organochlorés					
o,p DDT	165-235-354	0,70 ± 0,04 (354)	2,6 ± 0,1 (235)	0,47 ± 0,02	1,76 ± 0,09
p,p DDT	165-235-237	1,09 ± 0,05 (165)	3,6 ± 0,2 (235)	0,73 ± 0,04	2,4 ± 0,1
o,p DDD	165-199-235	1,36 ± 0,07 (199)	4,5 ± 0,2 (235)	0,90 ± 0,05	3,0 ± 0,2
p,p DDD	165-235-320	1,02 ± 0,05 (320)	3,5 ± 0,2 (235)	0,68 ± 0,03	2,3 ± 0,1
o,p DDE	246-248-318	2,7 ± 0,1 (318)	2,7 ± 0,1 (246)	1,77 ± 0,09	1,79 ± 0,09
p,p DDE	176-246-318	0,51 ± 0,03 (176)	1,70 ± 0,08 (246)	0,34 ± 0,02	1,13 ± 0,06
Méthoxychlore	227-343-344	1,08 ± 0,05 (343)	2,8 ± 0,1 (227)	0,72 ± 0,04	1,88 ± 0,09
HPTE	199-200-181	1,06 ± 0,05 (200)	9,1 ± 0,5 (199)	0,70 ± 0,04	6,1 ± 0,3

Tableau 2-2 : Limites de Détection et de Quantification (LD et LQ) des composés sélectionnées obtenues en CPG-SM à partir des effluents de STEP

Les limites de détection de la méthode obtenues pour les fongicides ainsi que pour les organophosphorés et les carbamates sont comprises entre 0,71 et 5,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (ppb), pour les pesticides organochlorés, les limites sont comprises entre 0,34 et 1,77 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (ppb). Rappelons, que les limites réglementaires dans les eaux potables sont de 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (ou ppb) pour un pesticide considéré et de 0,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (ou ppb) pour la somme des pesticides quantifiés [16].

3.1.3. Optimisation de la séparation de 11 composés

Nous avons sélectionné onze composés qui seront analysés par cette technique, cette sélection est basée sur les résultats obtenus et présentés dans le paragraphe suivant. Ces composés sont :

- Les pesticides organochlorés (DDT et ses dérivés, méthoxychlore et son métabolite HPTE)
- Les phtalates
- Le bisphénol A

Pour tous ces composés (11), nous avons travaillé sur une colonne HP5-MS qui permet d'aboutir à une séparation chromatographique satisfaisante (avec $R_s \text{ min} \geq 1,5$). Les différents paramètres tels que le gradient de température ainsi que la température de l'injecteur ont été optimisés pour la détection et la quantification de ces onze composés en mode SIM sur les trois ions sélectionnés.

Le débit d'hélium dans la colonne a été maintenu à 1,5 mL.min^{-1} . La température de l'injecteur a été fixée à 250°C et un volume de 2 μL a été injecté en mode splitless. Le gradient de température utilisé est le suivant :

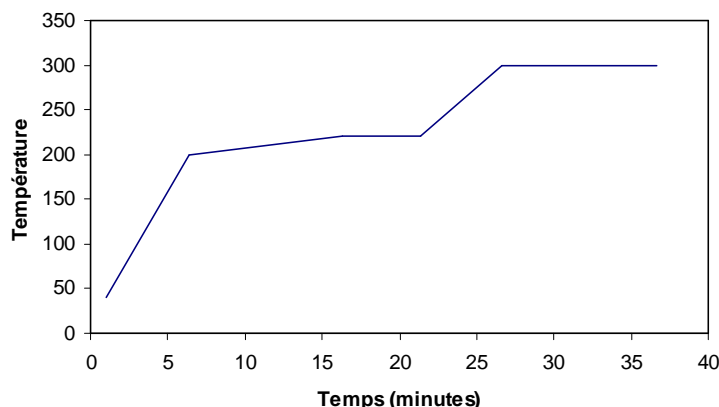


Figure 2-3 : Gradient de température optimisé et choisi pour l'étude

En ce qui concerne les paramètres de l'analyseur, différents mode d'ionisation ont été étudiés, ionisation chimique par le méthane ou l'ammoniaque et ionisation à impact électronique à 70 eV, les températures de la ligne de transfert entre le chromatographe et le spectromètre, ainsi que de la température de la source et celle du quadripôle au niveau du détecteur.

Finalement, le mode d'ionisation par impact électronique a été choisi, la température de la ligne de transfert entre le chromatographe et le spectromètre de masse a été réglée à 250°C et la température de source et celle du quadripôle à 230°C et 150°C respectivement.

Nous avons obtenu un chromatogramme type de la figure 2-4.

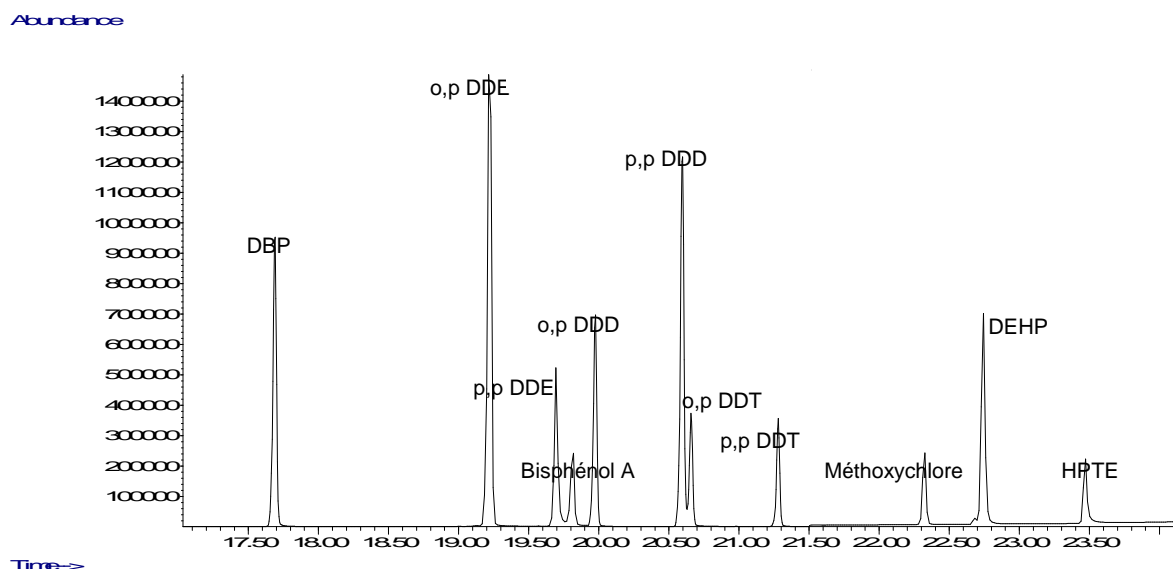


Figure 2-4 : Chromatogramme type d'un mélange des 11 composés recherchés (pesticides OCPs (8), phtalates (2) et le bisphénol A)

La quantification des composés recherchés est réalisée sur la détection de 3 ions en mode SIM, l'ion le plus abondant est utilisé pour la quantification, le moins abondant pour la détection, la présence des 3 ions est nécessaire pour la détection spécifique des composés selon la décision de la commission européenne 2002/657/EC [17], cf tableau 2-2.

L'analyse des 22 autres composés par CPG a posé un certain nombre de problèmes que nous allons détailler dans les paragraphes suivants.

3.1.4. Problèmes rencontrés lors de l'analyse par CPG-SM

Nécessité d'une analyse complémentaire en CPL-SM/SM

Notre première étude nous a conduit à évaluer la possibilité d'analyser la totalité des composés sélectionnés par une seule technique : la CPG-SM. Dans ce contexte, plusieurs problèmes se sont posés et afin de répondre au mieux aux exigences de la réglementation, nous avons travaillé également en analysant les substances les plus exigeantes par CPL-SM/SM.

Parmi les problèmes rencontrés lors de l'analyse par CPG, nous avons été confrontés à la dégradation thermique des carbamates dans le système d'injection, à la quantification délicate d'isomères de position ainsi qu'aux effets du solvant sur certains composés par changement de leur volatilisation dans l'injecteur.

3.1.4.1 Dégradation du propoxur (carbamate)

Les carbamates sont des composés polaires, très solubles dans l'eau (1750 mg.L⁻¹ pour le propoxur [18]) et thermolabiles. A cause de leur forte polarité et de leur instabilité thermique, leur séparation chromatographique est bien souvent limitée à la CPL. Pour analyser le propoxur par CPG, il serait alors nécessaire de le dériver, ce qui est difficilement envisageable dans une méthode d'analyse multifamilles. Néanmoins, grâce à certaines précautions telles qu'une programmation de la température d'injecteur (Program Temperature Vaporizer, PTV) ou d'une vitesse de gradient de

température adaptée, une dérivation des composés, une longueur d'aiguille et une injection « on column », il est possible de l'analyser par CPG [12, 19]. Nous avons donc évalué la séparation et la réponse du propoxur par CPG-SM par l'étude spécifique des différents paramètres, notamment des températures de travail (températures d'injecteur, du gradient et de la ligne de transfert). Ces étapes d'optimisation ont été réalisées sur un CPG couplé à un SM/SM quadripôle-trappe ionique de Thermo Finingan. Cet appareil nous permet en effet de travailler en IE et de passer rapidement en IC pour identifier les composés chromatographiés par la formation préférentielle de l'ion moléculaire ou de son adduit.

Initialement, nous avons déduit [19], que le propoxur se décompose thermiquement par un réarrangement de McLafferty pour donner le 2-isopropoxyphénol et de l'isocyanate comme montré sur la figure 2-5.

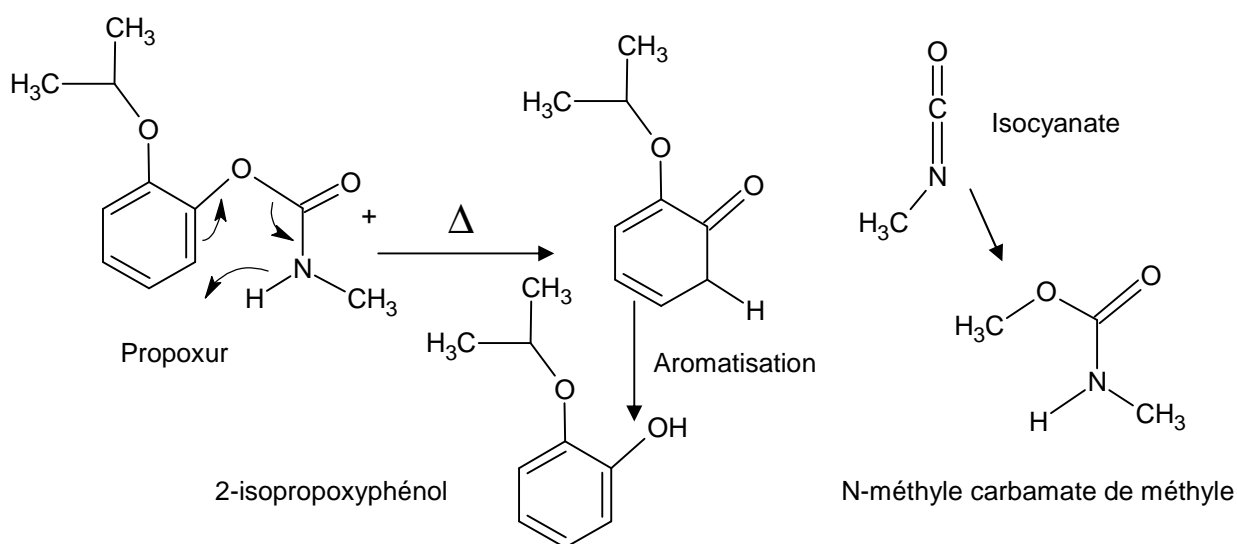


Figure 2-5 : Dégradation thermique du propoxur par réarrangement de MacLafferty avec formation de 2-isopropoxyphénol [19]

Nous avons vérifié ces résultats et le mécanisme proposé en procédant à une analyse d'une solution de propoxur solubilisé dans différents solvants avec une température d'injecteur de 250°C et grâce à une détection en ionisation chimique. Les pourcentages affichés sont calculés à partir du rapport des aires des 2 produits détectés. Pour chaque analyse de propoxur, le N-méthyle carbamate de méthyle a été détecté attestant la dégradation du propoxur.

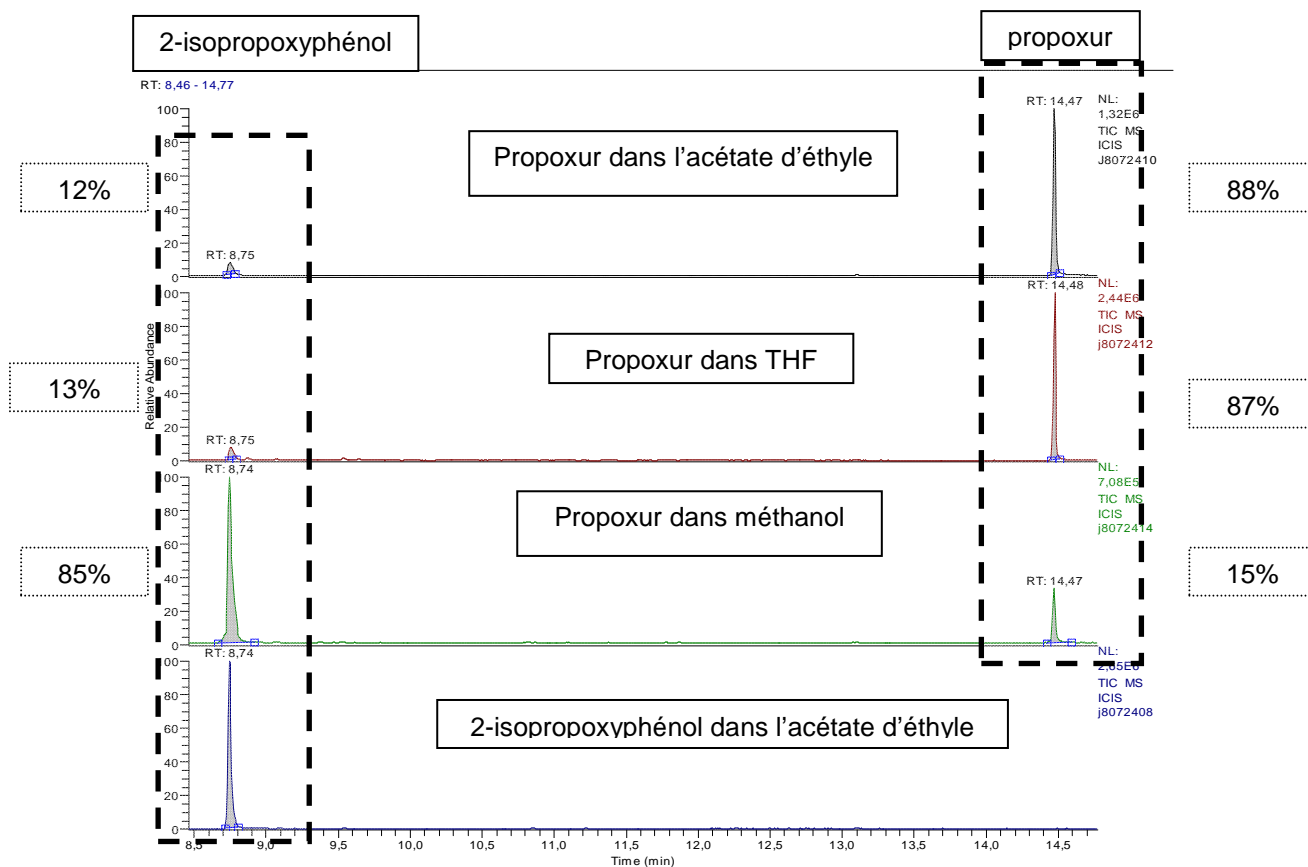


Figure 2-6 : Chromatogrammes des étalons du propoxur et du 2-isopropoxyphénol solubilisés dans différents solvants

Ces travaux nous ont permis de dégager la formation systématique plus ou moins importante de 2-isopropoxyphénol suivant le solvant utilisé, aboutissant à la quantification partielle du propoxur. Sur la figure 2-6, nous pouvons constater la formation du 2-isopropoxyphénol lors de l'analyse par CPG-SM du propoxur détectés respectivement à 8,58 minutes et 14,37 minutes. Nous avons utilisé un étalon pur de propoxur dont la pureté a été vérifiée par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ^1H et ^{13}C . Ces expériences traduisent donc une dégradation en voie solvant sur la partie labile de la molécule, le groupement carbamate juxtaposé au noyau aromatique.

Une série d'injections de propoxur solubilisé dans le méthanol, le THF et l'acétate d'éthyle a été menée en faisant varier la température de l'injecteur de 150°C à 250°C par palier de 50°C. Un chromatogramme du propoxur dans le méthanol est présenté sur la figure 2-5 à une température d'injecteur de 150°C, 200°C et 250°C. Les chromatogrammes du composé en solution dans l'acétate d'éthyle et le THF sont en annexe VII.

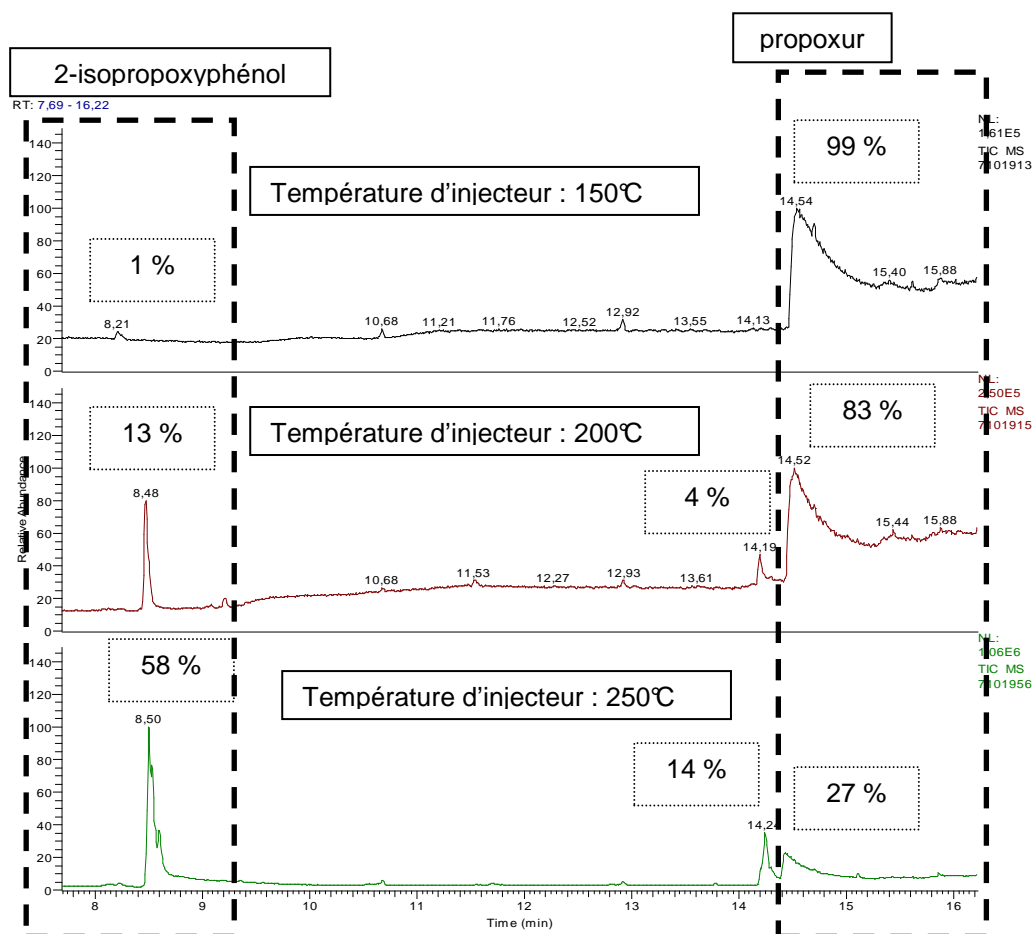


Figure 2-7 : Chromatogramme d'un étalon de propoxur solubilisé dans le méthanol suivant la température de l'injecteur

Ces travaux montrent une dégradation thermique croissante, de 1 à 58 % de propoxur détecté, sur le domaine de température d'utilisation du système d'injection réglé de 150°C à 250°C. Nous remarquons l'apparition d'un composé élué à 14,2 minutes juste avant l'élution du propoxur lorsqu'il est en solution dans le méthanol, cette molécule est non identifiée à ce jour. On peut néanmoins supposer qu'elle provient de dégradation de l'analyte, son spectre de masse et en particulier sa fragmentation sont très proche de ceux du propoxur. La trainée des pics observés pour une température d'injecteur de 150°C et même 200°C provient d'une mauvaise volatilisation dans la chambre de vaporisation lors de l'injection. Nous avons donc exclu de travailler dans ces conditions car il n'est pas recommandé de quantifier sur des pics chromatographiques non gaussiens (cf figure 2-7).

Nous retenons de ce travail, une dégradation thermique du propoxur lors de son introduction dans le système d'injection du système CPG-SM qui augmente en fonction de la température quelque soit le solvant utilisé. Il est donc impossible de quantifier le propoxur par cette technique analytique sans avoir à le dériver afin d'augmenter sa stabilité thermique ou d'avoir recours à un PTV indisponible au laboratoire.

3.1.4.2. Comportement chromatographique du 2-imidazolidinethione par CPG

Le 2-imidazolidinethione, métabolite de nombreux fongicides thiocarbamate, est une molécule de faible masse molaire et possède une structure moléculaire comportant un groupement thiocarbonyle labile greffé sur un noyau imidazolidine (cf Annexe IV). Ce type de structure moléculaire est mal

chromatographié aussi bien sur une colonne apolaire (HP-5MS) que sur une colonne peu polaire (DB-XLB). La figure 2-8 présente un chromatogramme obtenu après injection d'une solution de 2-imidazolidinethione dans l'acétonitrile sur une colonne HP-5MS. Le profil chromatographique obtenu est identique avec une DB-XLB. Le comportement chromatographique de cette substance, le pic traîne sur plus de 2 minutes d'élution, peut s'expliquer par les interactions multiples que cette molécule polaire peut avoir avec les sites de la phase stationnaire. La présence des atomes d'azote et de l'atome de soufre, nous permettent de supposer qu'il serait alors nécessaire d'employer une phase stationnaire encore plus polaire telle qu'une HP-50 (50% phényl - 50% diméthylepolysiloxane) ou DB-1701 ((14% cyanopropyl-phenyl)-méthylpolysiloxane) plus spécifique de ce type de composé. Malgré tout, cette solution n'est pas envisageable pour une analyse multifamilles.

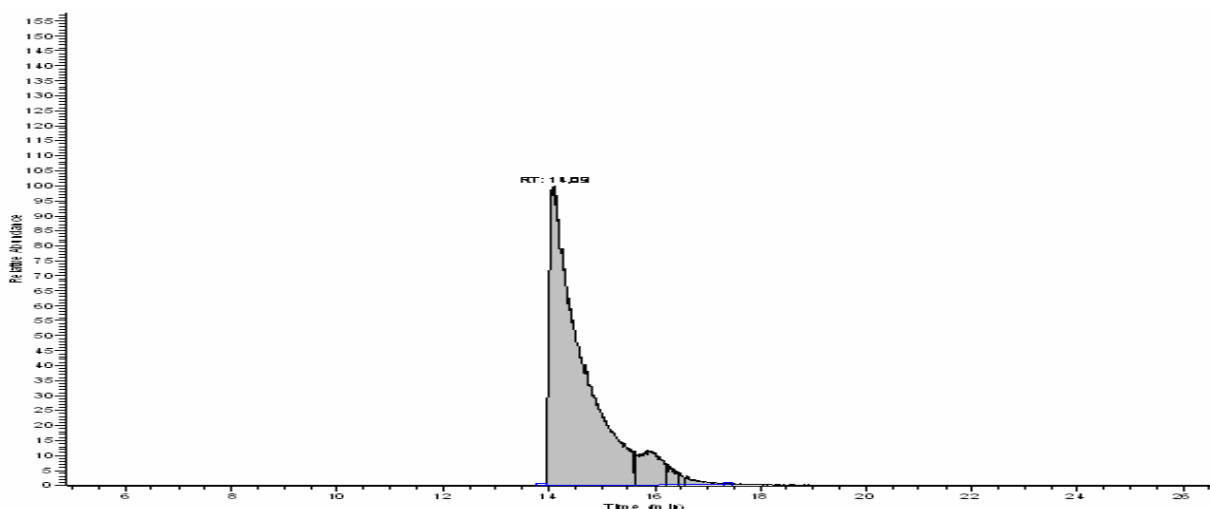


Figure 2-8 : Chromatogramme d'un étalon de 2-imidazolidinethione obtenu par CPG sur HP-5MS

Suite à ces différents résultats, nous avons également analysé tous les étalons dans 5 solvants différents, l'acétonitrile, l'acétate d'éthyle, l'acétone, le tétrahydrofurane (THF) et l'isopropanol.

3.1.4.3. *Effet du solvant*

Nous nous sommes rendus compte au cours de l'optimisation que l'utilisation de méthanol ne semblait pas donner une sensibilité optimale. Tous les composés ont été évalués et le HPTE a été l'analyte le plus affecté par le solvant d'injection. Des analyses répétées de HPTE dans différents solvants ont permis de mettre en évidence une nette différence de sensibilité (cf figure 2-9). Cette différence de sensibilité ne provient pas d'un problème de détection spectrométrique mais d'une différence de volatilisation du composé dans la chambre de vaporisation de l'injecteur. En outre, la présence de sites d'adsorption, tels les silanols libres présents sur le verre de la chambre, provoque une perte d'analytes lors du transfert de l'injecteur dans la colonne et diminue l'intensité du pic.

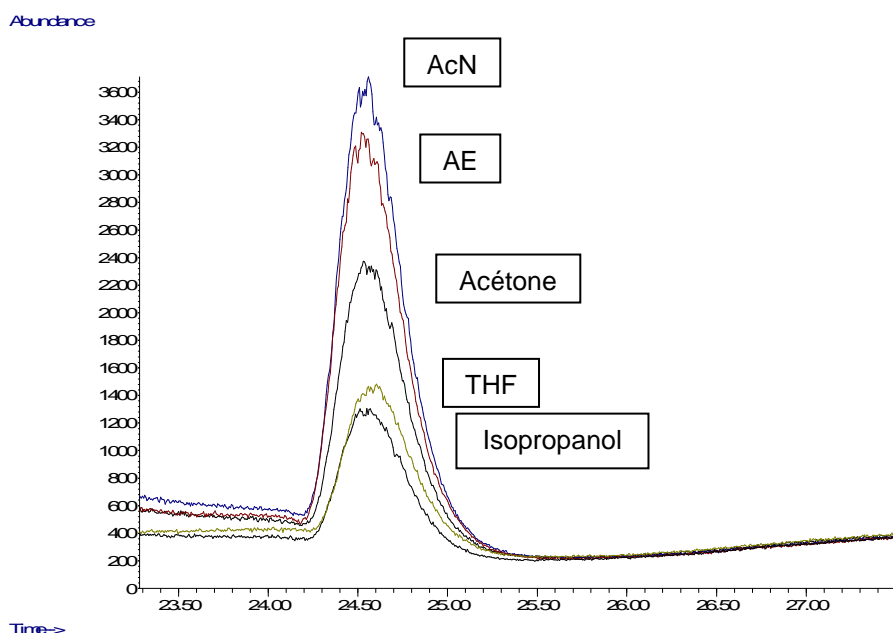


Figure 2-9 : Chromatogrammes d'une solution étalon de HPTE solubilisé dans 5 solvants

D'après ces résultats, le choix du solvant de reprise nous oriente vers l'utilisation de l'acétonitrile ou de l'acétate d'éthyle. Nous verrons lors de l'optimisation de la CPL-SM/SM, le choix définitif de ce paramètre de notre protocole d'analyse.

3.1.4.4. *Quantifications délicates des nonylphénols en CPG-SM*

Dans le premier chapitre, nous avons présenté la synthèse industrielle des APs, et nous avons vu que les NPs étaient présents dans les produits manufacturés sous la forme d'un mélange d'isomères de position de la chaîne alkyle. Ainsi, il a été nécessaire de travailler sur ces mêmes mélanges afin d'être au plus près de la réalité environnementale :

- isononylphénols CAS : 11066-49-2
- tert-octylphénol CAS : 140-66-9

Mais également sur les formes linéaires qui sont répertoriées dans certaines directives et règlement européens (cf annexe V) :

- 4n-nonylphénol CAS : 104-40-5
- 4n-octylphénol CAS : 1806-26-4

Ces étalons ont été évalués par RMN ^1H et ^{13}C (cf Annexe VIII) pour discerner la complexité d'isomérisation des alkylphénols, plus précisément des nonylphénols, utilisés dans l'industrie chimique par rapport à nos choix d'étalons.

Ces résultats ont été confirmés par les premiers travaux réalisés en CPG, le chromatogramme obtenu est présenté sur la figure 2-10.

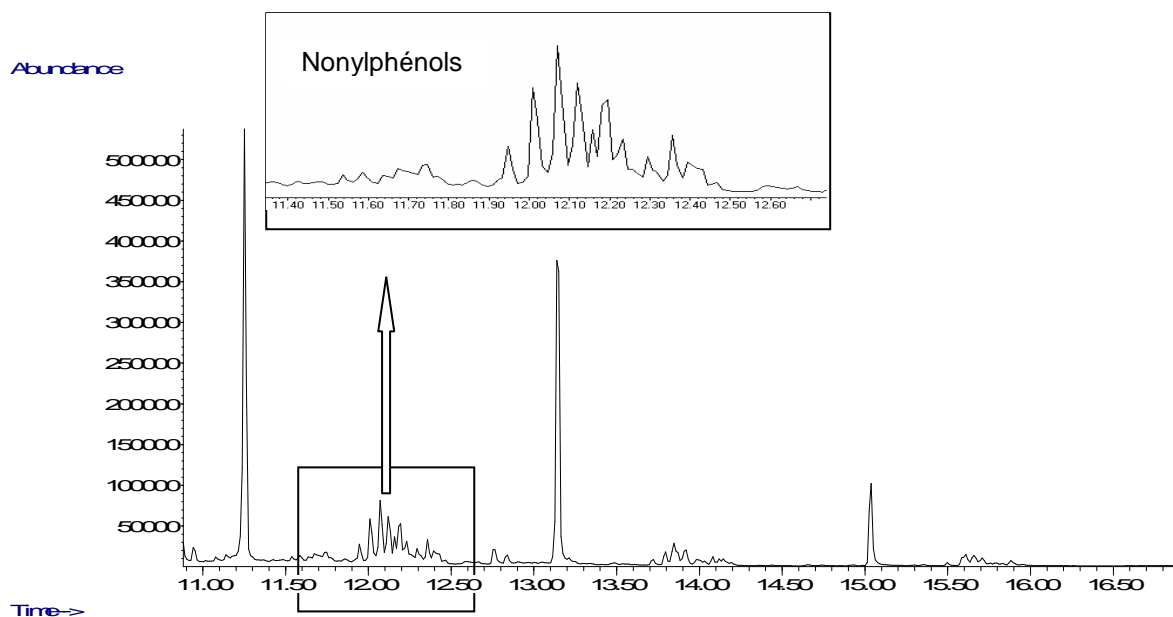


Figure 2-10 Chromatogramme d'un mélange des alkylphénols analysés

Nous pouvons constater que cette technique permet de séparer les isomères des nonylphénols. Néanmoins, le principal problème est de pouvoir quantifier de manière rigoureuse un massif de pics. En effet, l'intégration d'un tel massif présentant plus d'une dizaine de pics résolus n'est pas rigoureuse et ne répond pas aux normes européennes [15]. Nous avons donc décidé d'étudier ces composés par une autre technique analytique, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem qui est développée dans le paragraphe 3.2.

3.1.4.5. Sensibilités insuffisantes

Selon la directive 98/83 [4], l'Union Européenne définit la quantité maximale admissible dans les eaux potables à $0,10 \mu\text{g.L}^{-1}$ en pesticides et à $0,50 \mu\text{g.L}^{-1}$ en « Total pesticides ». On entend par pesticides, ceux appartenant à la même famille (cf directive 98/83, Annexe 1, Partie B, Note 6) et par « Total pesticides », la somme de tous les pesticides particuliers détectés et quantifiés dans le cadre de la procédure de contrôle [16]. Les limites de détection et de quantification obtenues sont résumées dans le tableau 2-2, elles ne permettent pas d'atteindre les seuils réglementaires pour certains composés, en particulier les fongicides et les pesticides organophosphorés et les carbamates. Nous avons donc envisagé d'autres possibilités analytiques pour atteindre les sensibilités recherchées sur ces composés telles que le choix d'une autre technique analytique, la CPL-SM/SM qui permet, comme nous le verrons, une meilleure quantification par une spécificité plus élevée.

3.1.5. Conclusion de l'étude des composés pour l'analyse par CPG-SM

En parallèle à cette étude sur la réponse des 33 composés en CPG-SM, nous avons évalué de manière qualitative la réponse en SM/SM via une source électrospray (détails dans le paragraphe 4.1.2.3.). Il est apparu que pour certains composés, tels que les pesticides organochlorés ou les phtalates, la sensibilité est inférieure à celle que l'on obtient par spectrométrie de masse avec ionisation par impact électronique.

En résumé, les différents problèmes analytiques rencontrés en CPG-SM pour 22 composés sont :

- un manque de sensibilité pour les fongicides,
- une quantification impossible ou partielle des carbamates
- une quantification simultanée de tous les APs délicates.

Nous avons décidé d'évaluer leur détection et leur quantification par CPL-SM/SM.

3.2. Analyse multi-résidus par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CPL-SM/SM)

La CPG présente de nombreux avantages tels qu'une analyse rapide et une résolution supérieure en comparaison de la CPL. En analyse d'ultra-traces de composés présents dans les matrices environnementales, le système de couplage CPL-SM/SM présente plusieurs avantages, tels que la sensibilité, la spécificité et la souplesse d'utilisation. Nous avons voulu évaluer les performances d'un tel système. Dans la première partie, nous avons optimisé les conditions chromatographiques (phase stationnaire, phase mobile, température du four) puis, dans une deuxième partie, nous avons sélectionné les meilleurs paramètres du spectromètre de masse afin d'obtenir une sensibilité maximale.

3.2.1. Appareillage

L'ensemble des analyses a été réalisé sur une chaîne Alliance 2695 (Waters, Milford, MA) couplée à un détecteur à barrettes de diode 995 Waters et à un spectromètre de masse à triple quadripôles Quattro LC de Micromass équipé d'une source Z-spray.

3.2.2. Optimisation de la séparation

La première étape de l'optimisation d'une méthode d'analyse en CPL est de définir les critères de performances du système chromatographique ($R_{s_{min}}$, k_{min} , $t_{analyse}$) puis de sélectionner et d'étudier les conditions ayant un effet significatif sur la séparation. Nous nous sommes fixés comme valeurs seuils une résolution minimale de 1,5, un facteur de rétention $k \geq 1,5$ et un temps d'analyse le plus court possible.

Pour notre part, nous avons d'abord travaillé sur les APs qui ont été les premiers composés à être étudiés car listés à l'annexe XVII du règlement REACH. Ceci nous a permis de choisir un type de phase stationnaire puis une composition de phase mobile. Puis nous avons adapté le gradient d'élution et la température d'analyse au reste des analytes que nous avons ajouté à l'étude.

3.2.2.1. Choix de la phase stationnaire et de la phase mobile

Suite à différents tests effectués sur les colonnes chromatographiques avec des compositions de phase mobile variées (acétonitrile, 2-Isopropanol, méthanol et eau UP), nous avons choisi une

colonne Uptispher C₁₈ 3HDO (3 µm, 100 x 2,0 mm diamètre interne) précédée d'une colonne de garde de même phase stationnaire (3 µm, 10 x 2,0 mm diamètre interne) fournies par Interchim.

Ce choix a été dicté par la bonne résolution obtenue sur les formes éthoxylés des APs difficilement chromatographiables sur d'autres phases stationnaires à cause de leur structure similaire. Nous avons alors travaillé en polarité de phase inversée avec des essais plus précis de compositions de phases mobiles. Nous avons testé différents pourcentages de phase organique comportant de l'acétonitrile, l'isopropanol, le méthanol et de phase aqueuse avec/sans ajout d'acide formique ou d'ammoniaque permettant de faire varier le pH et de contrôler les rétentions des analytes par recul d'ionisation. L'acétate de sodium et l'acétate d'ammonium ont également été employés afin d'améliorer la réponse du détecteur de masse par formation des adduits [M+Na⁺] et [M+NH₄⁺].

En conclusion, l'ajout d'un tampon acide ou basique n'a pas été choisi car une majorité de nos composés sont des molécules peu ionisables, la nature et la composition de la phase mobile ainsi que la température seront donc les critères étudiés afin d'obtenir une séparation satisfaisante en CPL phase inverse.

Ainsi, le choix final de la phase mobile employée, aboutissant à des compromis nécessaires à l'analyse multi-familles, a été d'utiliser un mélange méthanol – eau UP + acétate d'ammonium. La concentration en acétate d'ammonium a été évaluée et est présentée dans le paragraphe 3.2.2.5.

Le gradient a été optimisé à partir de celui proposé par Ferguson [20, 21] et repris par Loyo-Rosales [22]. Le débit est de 0,3 mL.min⁻¹ avec une composition initiale de phase mobile de 98 % en A (eau UP + acétate d'ammonium) durant les quatre premières minutes et ajustée à 44 % maintenue pendant 22 min., puis changée pour 23 % pendant 12 min. et pour finalement terminer l'élution des derniers composés à 100 % de méthanol pendant une période de 4 min. Six minutes sont nécessaires pour la remise en équilibre du système entre deux injections, totalisant un temps d'analyse de 44 minutes.

Le volume de délai du système étant de 800 µL, soit un temps de délai de 2,7 minutes, les temps de rétention portés sur le chromatogramme sont associés à des compositions de phase mobile décalées de 2,7 minutes. Le gradient est résumé sur la figure 2-11.

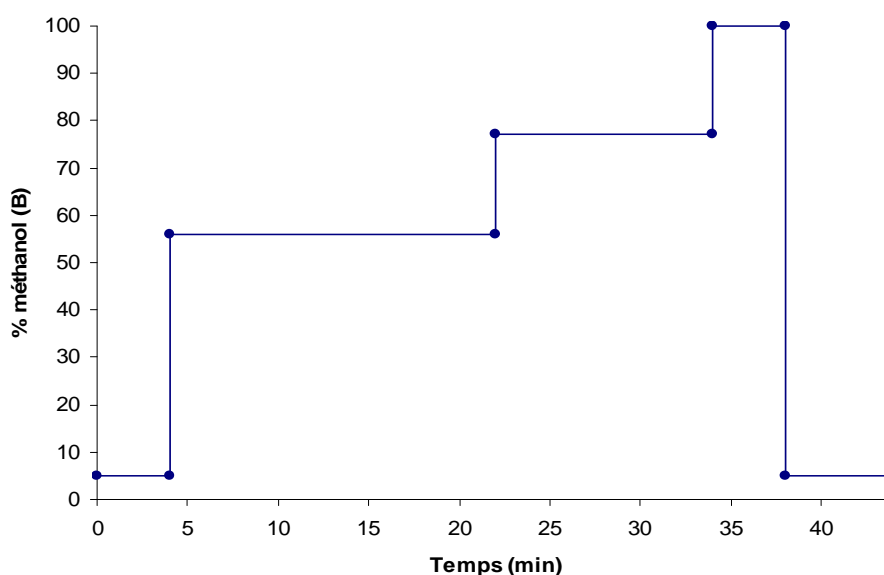


Figure 2-11 : Gradient de solvant utilisé en CPL

3.2.2.2. Etude de la température

La température est un critère important au cours d'une mise au point de méthode, nous avons donc décidé d'évaluer ce paramètre. En effet, la température intervient à plusieurs niveaux de la séparation chromatographique tels que le facteur de rétention k , sur le nombre de plateaux de la colonne et sur les échanges soluté↔phase mobile [23], elle diminue la viscosité de la phase mobile et augmente la cinétique d'échange soluté↔phase mobile permettant d'augmenter la finesse des pics.

Les effets de la température sur l'élution des solutés en CPL phase inverse sont traduits par l'équation de Van't Hoff :

$$\ln k = \Delta H^\circ / RT + \Delta S^\circ / R + \ln \Phi \quad \ln k = a / T + b$$

Équation 2-2 : Equation de Van't Hoff [23]

Où k représente le facteur de rétention du soluté, T la température (en Kelvin), ΔH° , ΔS° , R et Φ sont respectivement : l'enthalpie standard, l'entropie standard, la constante des gaz parfait et le rapport des volumes des phases (c'est-à-dire le rapport du volume de phase stationnaire, V_s , au volume de phase mobile, V_m , contenu dans la colonne) [23, 24]. Nous avons donc supposé que les paramètres thermodynamiques, l'entropie et le rapport des volumes des phases, sont constants sur le domaine de température où nous travaillons, température comprise entre 30 et 60°C. En outre la phase stationnaire utilisée ne doit pas être employée à des températures supérieures à 60°C.

$\ln k$ est donc une fonction affine de $1/T$ si et seulement si ces quatre grandeurs sont indépendantes de la température, avec a égal à $\Delta H^\circ / R$ et b à $\Delta S^\circ / R + \ln \Phi$. Les résultats sont donnés en annexe IX. Il a été vérifié expérimentalement que 20 composés analysés, exceptés le 2-imidazolidinethione et le méthamidophos, remplissent ces critères. On constate que la régression linéaire obtenue pour le 2-imidazolidinethione présente une ordonnée à l'origine, b , élevée, ce qui traduit une valeur de l'expression $\Delta S^\circ / R + \ln \Phi$ élevée. On peut supposer que la valeur de l'entropie est supérieure à la valeur du logarithme népérien du rapport des volumes des phases. Dans le cas du méthamidophos, le coefficient directeur de la droite de régression calculée est fortement négatif en comparaison des autres valeurs déterminées, excepté celui calculée pour le diméthomorphe 1. Dans les deux cas, de faibles variations de l'enthalpie pour le méthamidophos et de l'entropie pour le 2-imidazolidinethione sur le domaine de température choisi modifient fortement l'équation de la droite.

Ainsi, notre hypothèse de la linéarité des paramètres thermodynamique des 20 autres composés est valide sur le domaine de température où nous avons travaillé, c'est-à-dire que $\ln k$ est proportionnelle à $1/T$. Ainsi, par relation directe, on peut appliquer l'équation de la résolution est de la forme :

$$R_s = 1/4 * \sqrt{N} * [(\alpha - 1)/\alpha] * [k/(1 + k)]$$

Équation 2-3 : Equation de la résolution entre deux pics chromatographiques [23, 25]

où N est le nombre de plateaux théoriques de la colonne vis-à-vis de l'analyte le plus retenu, α le facteur de sélectivité. Les calculs sont résumés en annexe IX.

Pour étudier ce paramètre nous avons procédé à une première série d'injections à quatre températures différentes, 30 – 40 – 50 – 60 °C. L'augmentation de la température doit être suivie avec précautions sans quoi l'efficacité de la colonne s'en trouve réduite [26]. En effet, un élargissement des pics chromatographiques provoqué par la création d'un gradient de température à l'intérieur de la colonne peut avoir lieu durant la migration des solutés ; nous avons alors procédé à un préchauffage de la phase mobile avant son entrée dans la colonne chromatographique afin que la phase stationnaire et la phase mobile soient à la même température en tête de colonne et durant toute la durée de l'analyse. Les injections ont été réalisées trois fois successivement, et nous avons décidé d'ajouter à cette étude trois injections à une température de four de 45°C à la vue des bons résultats obtenus entre 40 et 50°C.

Les deux chromatogrammes des 22 composés analysés avec une température de colonne de 30 et 60°C sont donnés respectivement sur les figures 2-12 et 2-13.

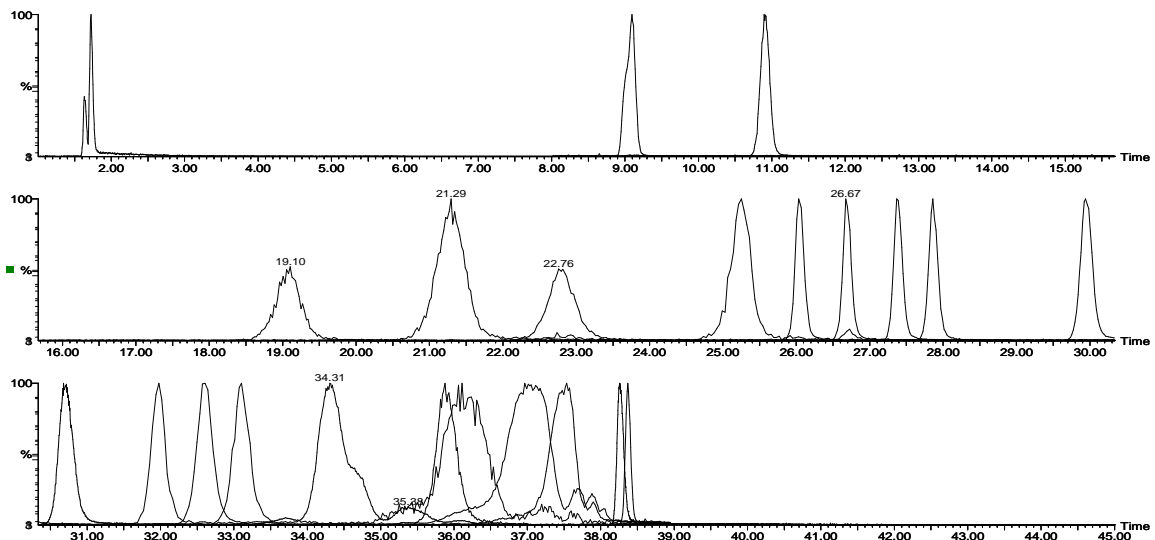


Figure 2-12 : Chromatogramme d'une solution étalon des 22 composés à une température de four de 30°C

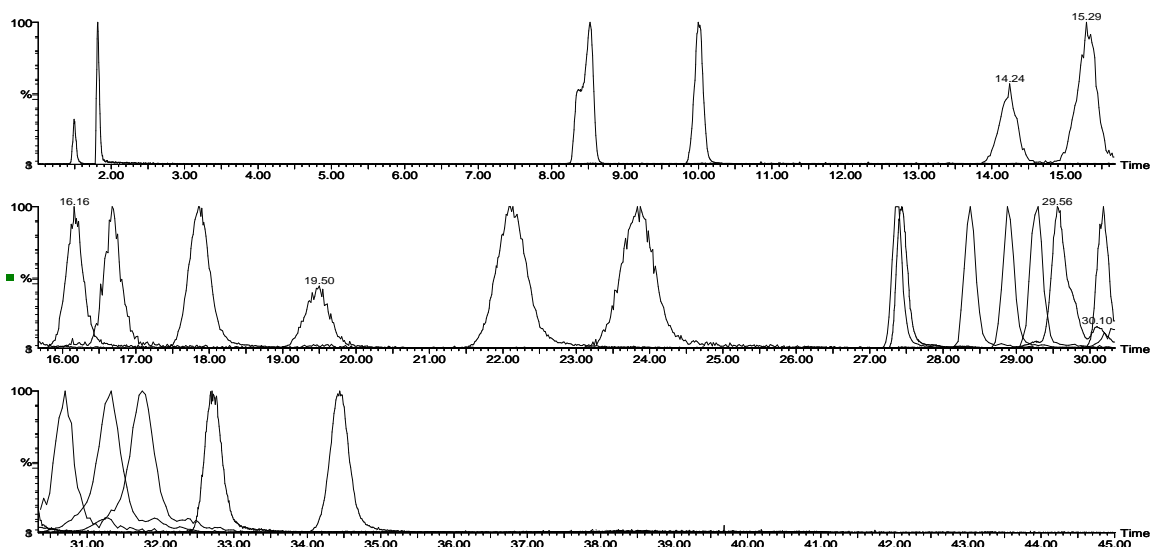


Figure 2-13 : Chromatogramme d'une solution étalon des 22 composés à une température de four de 60°C

Nous avons observé une diminution des temps de rétention lorsque T augmente, ce qui correspond à l'équation 2-2 et dont le facteur de rétention intervient directement dans l'équation 2-3. Nous avons procédé à un calcul de la résolution suivant l'équation 2-3. Pour réaliser ce calcul nous avons besoin de calculer le facteur de rétention k. Ceci a été effectué grâce à l'assimilation du temps mort du système au temps de rétention de l'uracil, composés pris comme référence pour une rétention nulle sur une phase stationnaire C-18. Ceci nous a permis d'obtenir les résolutions calculées entre le pic étudié et les deux pics voisins, résultats présentés dans le tableau 2-3.

Composés	Températures évaluées				
	30°C	40°C	45°C	50°C	60°C
2-imidazolidinethione	1,27	2,33	3,25	3,65	4,74
Méthamidophos	22,21	21,96	21,87	21,72	21,54
Diméthoate	4,52	4,42	4,33	4,23	4,05
Propoxur	11,76	10,41	9,81	9,25	8,15
Diméthomorphe 1	2,82	2,53	2,40	2,17	1,91
Diméthomorphe 2	1,77	1,75	1,73	1,63	1,44
Bromuconazole 1	2,70	1,93	1,46	1,31	0,85
Fluquinconazole	0,82	2,40	2,30	2,11	1,81
Tétraconazole	0,66	2,09	2,60	2,49	2,29
Bromuconazole 2	0,70	0,92	2,00	3,29	3,21
Tébuconazole	0,48	0,45	0,45	0,65	2,02
Hexaconazole	1,90	1,91	1,95	2,01	3,53
Prosulfocarbe	0,66	0,40	0,30	0,20	0,06
tert-OP	2,19	0,99	0,97	0,92	0,91
OP ₁ EO	0,53	0,53	0,50	0,50	0,47
OP ₂ EO	0,41	0,38	0,39	0,37	0,39
OP ₃ EO	0,97	0,68	0,54	0,45	0,27
NP ramifiés	1,20	0,93	0,81	0,69	0,54
4n-OP	0,17	0,31	0,36	0,48	0,46
NP ₁ EO	0,64	0,64	0,63	0,52	0,55
NP ₂ EO	0,42	0,44	0,45	0,46	0,36
NP ₃ EO	0,52	1,56	1,43	1,12	0,81
4n-NP	0,08	0,32	0,93	1,34	1,37
Pyridabène					

Tableau 2-3 : Valeurs de la résolution en fonction de la température du four

Les cases grisées présentent les valeurs acceptables de résolution obtenues entre chaque composé, gris clair pour les valeurs de Rs maximales inférieures à 1,5 et gris foncé pour les valeurs de Rs supérieures à 1,5. Nous avons donc toléré des compromis et nous avons choisi une température du four de 45°C pour l'analyse en CPL-SM/SM.

3.2.2.3. Optimisation de la détection en spectrométrie de masse

La deuxième étape de l'optimisation concerne le système de détection par spectrométrie de masse. Nous avons évalué les deux modes d'ionisation possibles à pression atmosphérique, APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) et ESI (ElectroSpray Ionisation) avec les deux polarités (négative et positive). Une optimisation complète des conditions d'acquisition des spectres de masse en mode scan puis en mode MRM a été réalisée (exemple sur les figures 2-14, 2-15 et 2-16). Pour

cela nous avons injecté en continu une solution à une concentration de 1 ppm ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) à un débit de $20 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ dans un mélange 50/50 eau UP / méthanol en présence ou non d'acide (acide formique) ou de base (ammoniaque) ou de sels (acétate d'ammonium) directement sur le spectromètre.

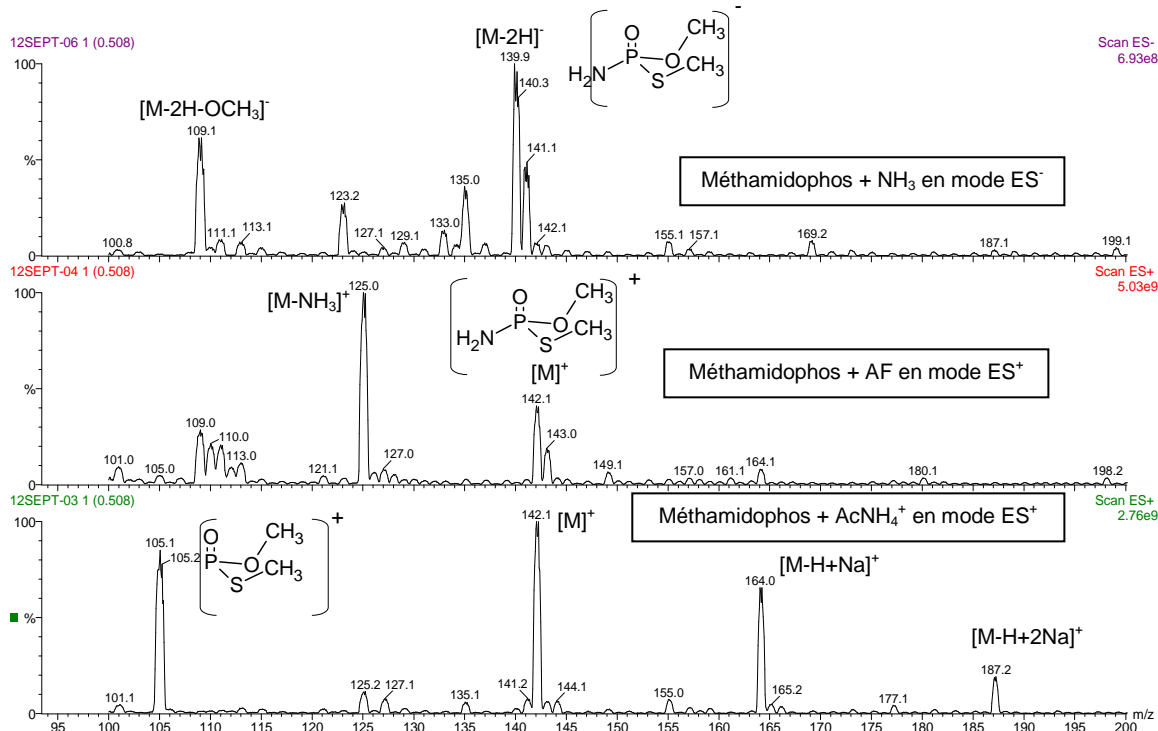


Figure 2-14 : Spectres de masse obtenus par scan dans différentes conditions (ajouts + polarité) lors de l'optimisation d'une solution de méthamidophos à 1 ppm, AF Acide Formique, AcNH_4^+ acétate d'ammonium

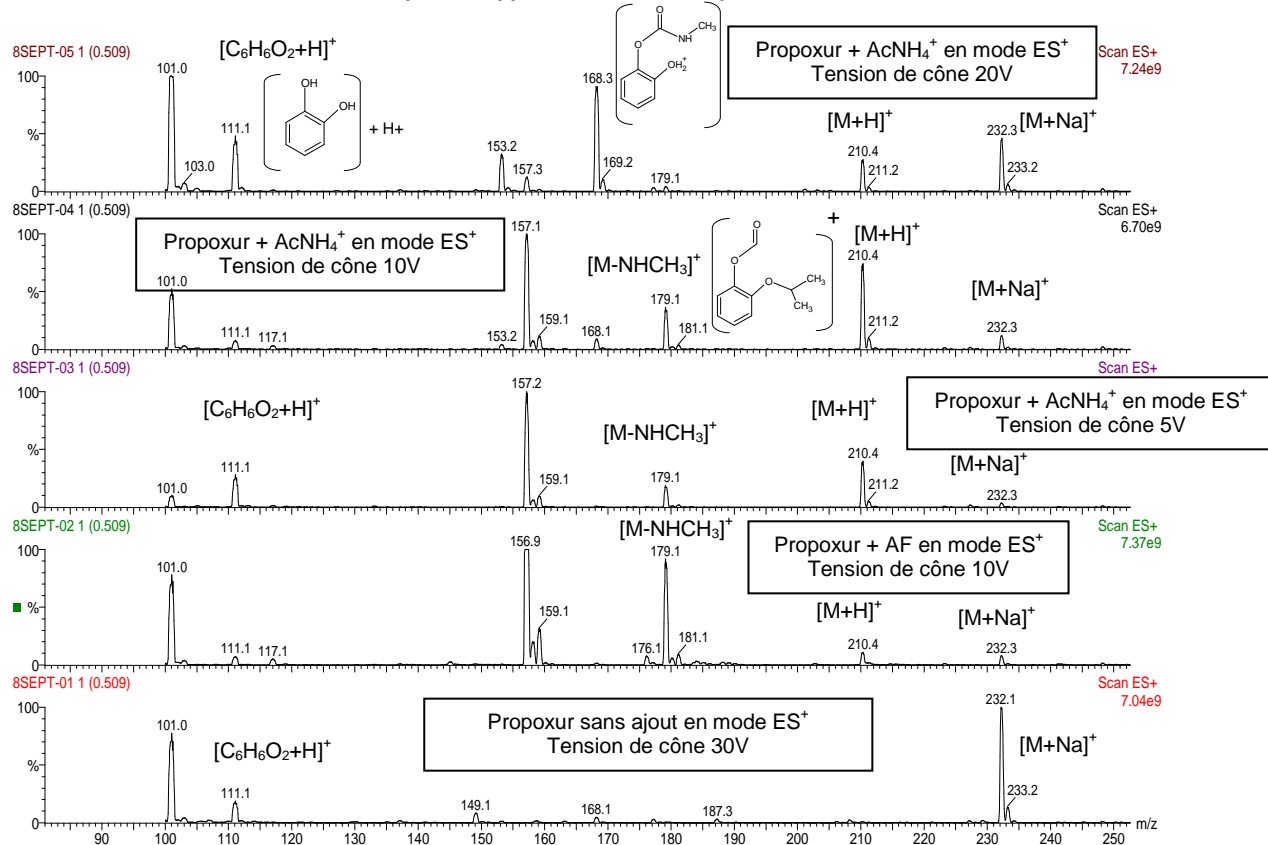


Figure 2-15 : Spectres de masse obtenus par scan dans différentes conditions (variations tension de cône + ajouts) lors de l'optimisation d'une solution de propoxur à 1 ppm, AF Acide Formique, AcNH_4^+ acétate d'ammonium

Le mode ESI s'est révélé être le mode dans lequel la sensibilité est la plus élevée, comme l'indiquait l'étude bibliographique [21, 27-37] et les conditions finales retenues sont :

- tension de capillaire fixée à 3,2 kV en mode ESI⁺ et 2,8 kV en mode ESI⁻
- les températures de désolvatation et de la source établies à 450 et 120°C respectivement,
- le gaz de balayage ajusté à un débit de 80 L.h⁻¹ pour le cône et 550 L.h⁻¹ pour la désolvatation.

Sur les deux spectres donnés, un maximum de masses ont été interprétées, certaines structures restent difficiles à déterminer du fait de nombreux réarrangement au sein de la source ESI ; mais lorsque cela était possible, nous avons choisi l'adduit [M+NH₄⁺] ou l'ion pseudo-moléculaire [M+H]⁺ en mode positif, car ces adduits sont plus fragiles que l'adduit [M+Na⁺] et le [M-H]⁻ en mode négatif. Des adduits fragiles favorisent la formation d'ions fils produits dans la cellule de collision.

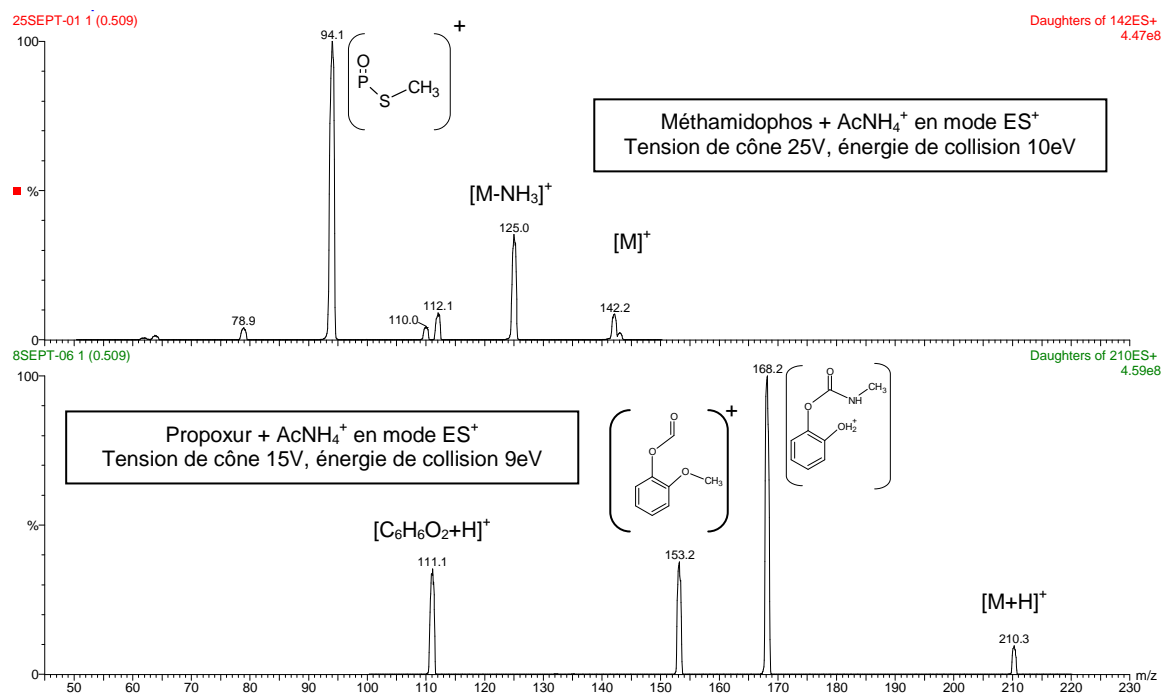


Figure 2-16 : Spectres de masse obtenus en mode MRM pour la recherche des ions fils, exemple du méthamidophos et du propoxur, AcNH₄⁺ acétate d'ammonium

Sur un spectromètre de masse à triple quadripôle, comme celui utilisé dans ce projet, le premier quadripôle sélectionne l'ion parent à analyser, ensuite le deuxième sert de cellule de collision et permet la fragmentation de l'ion choisi par collision avec un gaz inerte tel que l'argon. Le troisième quadripôle effectue le balayage des ions fils produits. Après sélection de la tension de cône donnant le maximum d'abondance des adduits, nous avons réalisé un choix des ions fils issus des adduits avec une énergie de collision optimisée pour chacun d'entre eux. Le tableau 2-4 récapitule les paramètres CPL-SM/SM fixés pour l'étude.

L'appareillage employé permet de suivre les différentes transitions retenues selon des plages de temps programmées. L'acquisition d'une transition dure 100 ms, il est appelé « dwell time ». Le temps nécessaire au système entier pour changer les tensions de cône et énergie de collision entre chaque acquisition est de 50 ms et est appelé « Inter-channel delay ». Ainsi nous pouvons suivre simultanément sur toute la durée de l'élution des analytes les ions fils produits pour chaque transition choisie.

Composés	Tr (min)	Mode d'ionisation	Ion parent	Transitions	Tension de cône (V)	Energie de collision (eV)
2-Imidazolidinethione (1)	1,6	ES+	[M+H] ⁺	103,3 → 43,8 103,3 → 60,0 103,3 → 86,0	30 30 30	30 30 30
Méthamidophos (2)	1,8	ES+	[M+H] ⁺	142,2 → 94,1 142,2 → 125,0	25 25	10 10
Diméthoate (3)	8,8	ES+	[M+H] ⁺	230,2 → 87,0 230,2 → 101,1 230,2 → 199,1	15 15 15	10 10 10
Propoxur (4)	10,4	ES+	[M+H] ⁺	210,3 → 101,1 210,3 → 153,3 210,3 → 168,2	15 15 15	9 9 9
Diméthomorphe (5 et 5') (a)	16,3 – 17,8	ES+	[M+H] ⁺	388,2 → 139,0 388,2 → 165,0 388,2 → 300,9	10 10 10	30 30 20
Bromuconazole (6 et 6') (a)	19,0 - 24,2	ES+	[M+H] ⁺	378,0 → 159,0 378,0 → 160,9 378,0 → 173,0	20 20 20	30 30 30
Fluquinconazole (7)	20,1	ES+	[M+H] ⁺	376,0 → 272,0 376,0 → 306,8 376,0 → 348,8	20 20 20	30 20 20
Tétraconazole (8)	21,9	ES+	[M+H] ⁺	372,0 → 159,0 372,0 → 205,0	25 25	25 15
Tébuconazole (9)	26,1	ES+	[M+H] ⁺	308,2 → 70,0 308,2 → 125,1 308,2 → 151,0	28 28 28	22 22 22
Hexaconazole (10)	26,6	ES+	[M+H] ⁺	314,2 → 69,8 314,2 → 159,0	20 20	20 20
Prosulfocarbe (11)	28,6	ES+	[M+H] ⁺	252,3 → 86,0 252,3 → 91,0 252,3 → 128,1	10 10 10	15 15 15
tert-OP (12)	28,9	ES-	[M-H] ⁻	205,3 → 133,0	30	30
OP ₁ EO (13)	30,0	ES+	[M+NH ₄] ⁺	268,5 → 113,3 268,5 → 139,2 268,5 → 251,3	10 10 10	10 10 10
OP ₂ EO (14)	30,6	ES+	[M+NH ₄] ⁺	312,4 → 113,3 312,4 → 183,1	10 10	15 10
OP ₃ EO (15)	31,0	ES+	[M+NH ₄] ⁺	356,5 → 164,9 356,5 → 227,2 356,5 → 339,2	20 20 20	20 15 10
NP ramifiés (16)	31,6	ES-	[M-H] ⁻	219,3 → 147,0 219,3 → 133,0	30 30	30 30
4n-OP (17)	32,6	ES-	[M-H] ⁻	205,2 → 106,0	40	25
NP ₁ EO (18)	33,0	ES+	[M+NH ₄] ⁺	282,4 → 85,1 282,4 → 127,3 282,4 → 138,9	10 10 10	15 10 10
NP ₂ EO (19)	33,8	ES+	[M+NH ₄] ⁺	326,4 → 89,1 326,4 → 165,2 326,4 → 183,1	10 10 10	20 15 10
NP ₃ EO (20)	34,4	ES+	[M+NH ₄] ⁺	370,4 → 133,2 370,4 → 227,1	20 20	15 10
4n-NP (21)	36,3	ES-	[M-H] ⁻	219,2 → 106,1	35	25
Pyridabène (22)	37,5	ES+	[M+H] ⁺	365,2 → 147,1 365,2 → 308,9	10 10	20 15

Tableau 2-4 : Composés détectés en CPL-SM/SM (a) diastéréoisomères

Le tableau 2-4 regroupe les données pour chacun des composés, ils sont triés par ordre d'élution, les temps de rétention donnés sont ceux obtenus après optimisation générale des derniers paramètres concernant l'acétate d'ammonium et le solvant d'injection.

3.2.2.4. Optimisation de la présence d'acétate d'ammonium

Le couplage CPL-SM/SM est dépendant de nombreux paramètres propres aux deux systèmes, la détection par spectrométrie de masse est particulièrement affectée par la composition de la phase mobile et la concentration en sel employé (ici l'acétate d'ammonium noté AcNH_4^+). Il s'agit d'un paramètre que l'on ne peut évaluer qu'en mode de couplage direct avec un gradient d'élution. Cela nécessite donc d'injecter un mélange étalon dans les conditions du gradient en faisant varier cette quantité présente en phase aqueuse (eau Ultra Pure, UP) et en phase organique (méthanol, MeOH). Des injections sans acétate d'ammonium ont été testées et nous ont montré que le sel améliore l'ionisation des molécules lors de la séparation et de la détection. Dans le but de déterminer la phase qui contiendra le sel d'ammonium nous avons d'abord travaillé avec trois compositions de phase mobile possibles :

- eau UP + AcNH_4^+ / MeOH
- eau UP / MeOH + AcNH_4^+
- eau UP + AcNH_4^+ / MeOH + AcNH_4^+

Le tableau 2-5 présente les résultats obtenus pour les 3 compositions de phase mobiles possibles, l'aire obtenue est rapportée à celle mesurée avec la composition $\text{H}_2\text{O} + \text{AcNH}_4^+ / \text{MeOH}$. La concentration en acétate d'ammonium a été fixée à 10 mM.

Composés	$\text{H}_2\text{O} + \text{AcNH}_4^+ / \text{MeOH}$	$\text{H}_2\text{O} / \text{MeOH} + \text{AcNH}_4^+$	$\text{H}_2\text{O} + \text{AcNH}_4^+ / \text{MeOH} + \text{AcNH}_4^+$
2-Imidazolidinethione	100%	252%	97%
Méthamidophos	100%	180%	106%
Diméthoate	100%	80%	74%
Propoxur	100%	98%	88%
Diméthomorphe	100%	91%	73%
Bromuconazole	100%	80%	67%
Fluquiconazole	100%	89%	65%
Tetraconazole	100%	28%	23%
Tébuconazole	100%	69%	63%
Hexaconazole	100%	68%	62%
Prosulfocarbe	100%	55%	47%
NPs	100%	0%	0%
OP ₁ EO	100%	51%	44%
OP ₂ EO	100%	70%	65%
OP ₃ EO	100%	71%	68%
OPs	100%	0%	0%
NP ₁ EO	100%	36%	32%
NP ₂ EO	100%	59%	55%
NP ₃ EO	100%	60%	60%
Pyridabène	100%	54%	54%

Tableau 2-5 : Sensibilité obtenue pour chacun des composés en fonction de la composition de la phase mobile en acétate d'ammonium

Ces résultats nous permettent de déduire que la sensibilité est maximale lorsque l'acétate d'ammonium est en phase aqueuse pour la grande majorité des composés. Les NPs et OPs ne sont pas détectés lorsque l'acétate d'ammonium est présent dans le méthanol. Néanmoins, on constate que nous perdons de la sensibilité pour le méthamidophos et le 2-imidazoldinethione dont la détection

est meilleure avec une composition de phase mobile eau UP et acétate de sodium dans le méthanol. On peut également remarquer que l'utilisation d'une phase aqueuse et d'une phase organique comportant toutes les deux de l'acétate d'ammonium inhibe le signal du spectromètre de masse, la sensibilité diminuant de plus de 23% pour certains composés. Il s'agit une nouvelle fois de trouver le meilleur compromis, nous retiendrons alors que l'acétate d'ammonium doit être présent dans la phase aqueuse.

3.2.2.5. Optimisation de la concentration en acétate d'ammonium

Couramment, il est utilisé de 1 à 10 mM de sel [21], pour notre part, nous avons travaillé avec cinq concentrations différentes 1,5 - 2,5 - 5 - 10 - 15 mM. Les résultats sont répertoriés dans le tableau 2-6, l'aire obtenue est rapportée à celle obtenue pour 1,5 mM :

Composés	1,5 mM	2,5 mM	5 mM	10 mM	15 mM
2-Imidazolidinethione	100%	85%	63%	55%	47%
Méthamidophos	100%	106%	96%	87%	77%
Diméthoate	100%	99%	83%	67%	58%
Propoxur	100%	84%	68%	61%	54%
Diméthomorphe	100%	85%	72%	55%	44%
Bromuconazole	100%	93%	83%	61%	52%
Fluquiconazole	100%	96%	78%	54%	44%
Tetraconazole	100%	90%	73%	59%	51%
Tébuconazole	100%	89%	74%	59%	51%
Hexaconazole	100%	92%	76%	59%	51%
Prosulfocarbe	100%	86%	68%	51%	39%
NPs	100%	75%	61%	32%	18%
OP ₁ EO	100%	117%	55%	42%	30%
OP ₂ EO	100%	86%	71%	60%	51%
OP ₃ EO	100%	75%	81%	65%	58%
OPs	100%	70%	58%	31%	18%
NP ₁ EO	100%	82%	61%	43%	32%
NP ₂ EO	100%	84%	70%	57%	47%
NP ₃ EO	100%	86%	74%	60%	55%
Pyridabène	100%	98%	91%	72%	60%

Tableau 2-6 : Pourcentage de sensibilité obtenue pour chacun des composés en fonction de la concentration d'acétate d'ammonium en phase aqueuse

Ces résultats nous montrent une diminution progressive de l'intensité des pics pour une augmentation de la concentration en acétate d'ammonium, sauf pour le OP₁EO et le méthamidophos. On peut justifier cette diminution par plusieurs hypothèses émises dans la littérature [38] :

- une augmentation du diamètre du spray à des hautes concentrations en sels ($> 10^{-3}$ M) ce qui entraîne une perte d'efficacité de transmission des ions vers le spectromètre,
- une augmentation de la charge des gouttelettes rend leur désolvatation plus difficile.

Des essais ont été réalisés à une concentration de 1 mM et la sensibilité obtenue est équivalente à celle obtenue à 1,5 mM à +/- 5 % (en rapport d'aire). Néanmoins, la reproductibilité moyenne sur 5 injections des 22 composés, à 1 mM, est de 7,5 %, alors qu'elle est de 3,8 % pour une concentration

en acétate d'ammonium de 1,5 mM. Nous avons donc fixé la concentration en acétate d'ammonium à 1,5 mM, qui est la concentration favorable à tous les composés analysés par CPL-SM/SM.

3.2.2.6. *Choix du solvant et du volume d'injection*

En CPL, nous cherchons le solvant et le volume adéquats de l'extrait qui permettent d'atteindre une bonne sensibilité (quantité maximale d'analytes injectée dans le système) et parallèlement une excellente performance de séparation (résolution, formes des pics). Pour cela, le solvant doit :

- solubiliser les analytes,
- être compatible avec le système phase stationnaire/éluant assurant la séparation,
- être compatible avec le système de détection.

Nous avons vu l'importance de la nature du solvant de l'échantillon dans le cas d'une analyse par CPG-SM (cf § 3.1.4.3.). En CPL, il est souvent conseillé d'utiliser un solvant dont la force éluante est plus faible que celle de la phase éluante ou identique à la composition de phase mobile de départ. De plus, dans notre étude, le même échantillon doit pouvoir être injecté en CPL et en CPG et nous devons employer un minimum d'eau en CPG (% H₂O < 25 % en volume préconisé par le fournisseur de la colonne CPG, J&W) afin de ne pas altérer la phase stationnaire de la colonne chromatographique. Ainsi, il est plus aisé de pouvoir reprendre le même extrait sans avoir à le diluer entre les deux techniques employées.

D'après les résultats obtenus en CPG et présentés dans le paragraphe 3.1.4.3., il est préférable d'injecter notre échantillon dans quatre solvants : l'acétonitrile, l'isopropanol, l'acétone et le THF essentiellement pour le HPTE. L'acétate d'éthyle ne peut être utilisé en CPL en raison de sa non-miscibilité avec la composition de phase mobile initiale pour des injections supérieures à 5 µL. Nous avons donc injecté nos 22 composés dans ces quatre solvants, l'acétonitrile, l'isopropanol, l'acétone et le THF suivant le même gradient. L'étude sur tous les composés nous a permis de mettre en évidence que seule la séparation du 2-imidazolidinethione et du méthamidophos, composés très polaires sont affectés par le solvant de l'échantillon. Le reste de la séparation des analytes est identique quelque soit le solvant. Nous avons obtenu les chromatogrammes présentés sur la figure 2-17 et sur la figure 2-18.

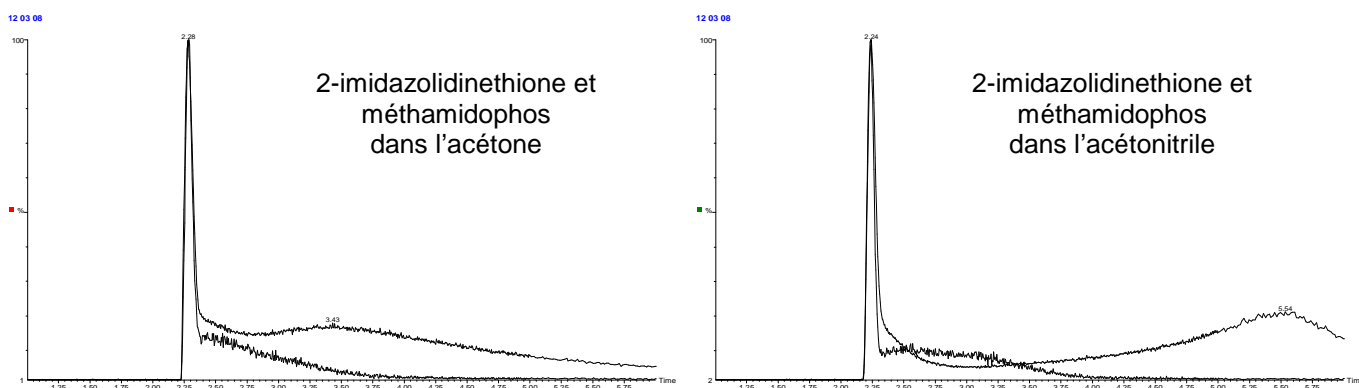


Figure 2-17 : chromatogrammes du 2-imidazolidinethione et du méthamidophos injectés dans l'acétone et dans l'acétonitrile séparation

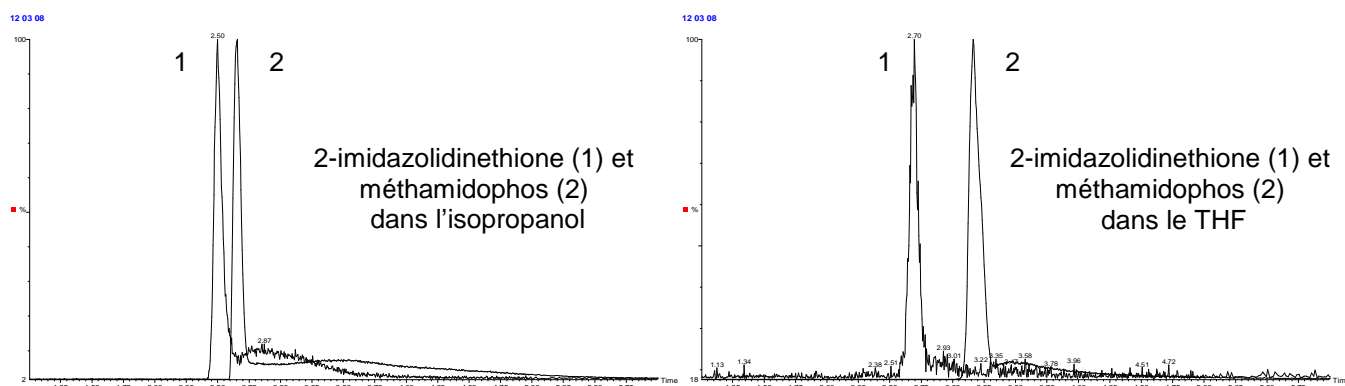


Figure 2-18 : Chromatogrammes du 2-imidazolidinethione (1) et du méthamidophos (2) injectés dans l'isopropanol et dans le tétrahydrofur séparément

Sur la figure 2-17, on constate une coélution des 2 composés et une trainée de pic importante qui peut être expliquées par la différence de force éluante entre l'acétone, l'acétonitrile et l'isopropanol dont leurs valeurs sont voisines de 0,6, celle du THF qui est plus faible, 0,45 (cf annexe X). En CPL phase inverse, ce phénomène est surtout remarqué pour les composés les moins retenus et lorsque les propriétés telles que la viscosité et la force éluante du solvant de l'échantillon sont très éloignées de celles de la phase mobile [39]. Sur la figure 2-18, les 2 composés sont séparés et la trainée de pic persiste avec l'isopropanol et disparaît lorsque l'on solubilise les analytes dans le THF. La séparation est donc meilleure en terme de résolution lorsque le solvant est l'isopropanol et bien meilleure encore pour le THF. Ce gain de résolution peut s'expliquer par la meilleure dissolution du THF dans la phase mobile entraînant une rétention plus forte pour le méthamidophos [39, 40].

Ceci s'explique par la différence de polarité et de force éluante du THF par rapport à l'isopropanol (alcool), l'acétone (cétone) ou l'acétonitrile (nitrile). La force éluante du THF, un éther est plus faible que celle de l'acétonitrile, de l'isopropanol et de l'acétone (cf Annexe X) entraînant une concentration des analytes en tête de colonne. Nous avons donc décidé d'utiliser le THF comme solvant de l'échantillon. En outre, expérimentalement nous avons constaté que l'ajout d'une faible proportion d'eau dans l'extrait améliore la finesse des deux premiers pics. Ceci s'explique par la différence de force éluante entre le solvant de l'échantillon et celle de la phase mobile (début du gradient à 98% d'eau). Cette situation entraîne une « dilution » lente des analytes dans la phase mobile provoquant des déformations de pics. Ces déformations sont provoquées par la différence de migration des analytes qui se diluent entre la phase mobile très éluante et le solvant de l'échantillon beaucoup moins éluante. L'extrait sera donc repris avec un maximum d'eau de 25 % en volume.

Pour évaluer le volume d'injection maximal sans déformation de la symétrie des pics chromatographiques, nous avons procédé à des injections de 5-10-15-20-25-30 μL d'une solution à 5 ppm de chaque composés dans le THF. Sur la colonne analytique de diamètre 2,1 mm que nous avons utilisée, il est apparu que la symétrie des pics ainsi que leur reproductibilité sont bien meilleures avec une injection de 10 μL . Ce volume sera notre volume d'injection pour la méthode (cf figure 2-19). En parallèle, nous avons vérifié que la sensibilité d'une solution étalon des 11 composés analysés par CPG n'était pas modifiée lorsque le solvant était le THF.

En conclusion, les conditions chromatographiques optimisées de l'analyse par CPL peuvent se résumer ainsi :

- Colonne Uptispher C-18 3HDO, 100*2,1 mm ; 3 µm de granulométrie précédée d'une colonne de garde de phase stationnaire identique de taille 10*2,0 mm
- Température de four 45°C
- Volume injecté 10 µL, solvant de l'échantillon THF
- Phase mobile composée d'eau UP + AcNH₄⁺ à 1,5 mM / MeOH

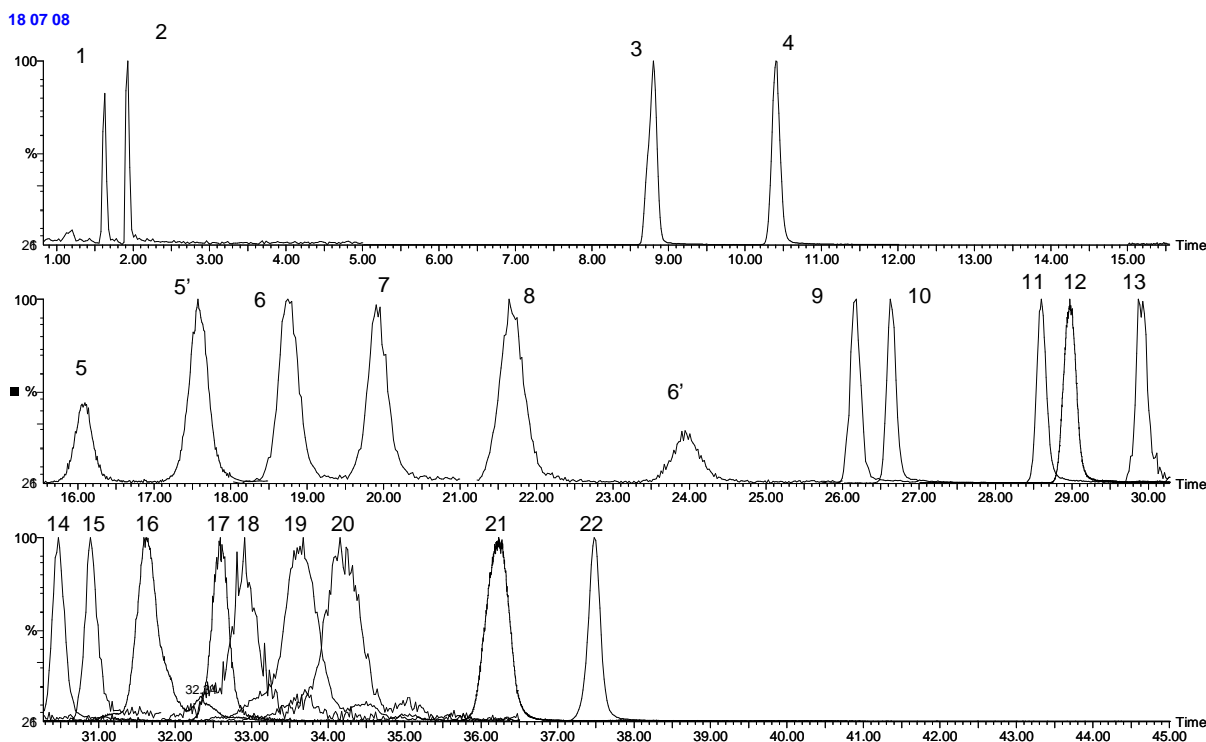


Figure 2-19 : Chromatogramme type obtenu en CPL-SM/SM pour les 22 composés en solution dans le THF

3.2.3. Sensibilité suivant les familles de composés

Une fois la séparation chromatographique mise au point sur les 22 composés choisis pour être analysés en CPL, nous avons évalué les limites de détection et de quantification de la même manière que la méthode présentée dans le paragraphe 3.1.2. En spectrométrie de masse en tandem nous travaillons sur des transitions ions parents- ions fils, tandis que pour l'analyse des onze composés par CPG-SM nous avons travaillé sur des ions caractéristiques.

Grâce au travail effectué en introduction directe sur le spectromètre de masse, nous avons déterminé les fragmentations les plus importantes pour chacun des analytes (cf § 3.2.2.3.). Le choix des fragments se fait suivant leur intensité mais aussi suivant leur spécificité. Nous avons choisi un minimum de trois fragments en accord avec la décision de commission 2002/657/CE de l'Union Européenne [15]. Il s'agit d'une condition nécessaire pour certifier sans ambiguïté la présence des substances recherchées. Au cours de l'analyse, nous avons suivi plusieurs transitions, en travaillant en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring). La limite de quantification est calculée sur la transition la plus intense, la limite de détection est calculée sur la transition la moins intense. Les résultats sont regroupés dans le tableau 2-7, les composés numérotés 15 et 20 sur la figure 2-19

sont les formes triéthoxylées qui sont détectés mais pas quantifiés et ne figurent donc pas dans le tableau 2-7 (cf § 2.). Les limites rapportées à la méthode sont associées à un coefficient de concentration de 1500, soit 300 mL d'échantillon concentré dans 200 µL.

Composés	LD instrumentale en ppb (MRM)	LQ instrumentale en ppb (MRM)	LD méthode en ppt	LQ méthode en ppt
2-Imidazolidinethione (1)	320 ± 20 (103,3 → 86,0)	1060 ± 50 (103,3 → 60,0)	210 ± 10	710 ± 40
Méthamidophos (2)	10,8 ± 0,5 (142,2 → 125,0)	36 ± 2 (142,2 → 94,1)	7,2 ± 0,4	24 ± 1
Diméthoate (3)	38,5 ± 2 (230,2 → 199,1)	128 ± 6 (230,2 → 87,0)	26 ± 1	85 ± 4
Propoxur (4)	36 ± 2 (210,3 → 153,3)	121 ± 6 (210,3 → 101,1)	24 ± 1	81 ± 4
Diméthomorphe (5 et 5')	14,7 ± 0,7 (388,2 → 300,9)	49 ± 2 (388,2 → 139,0)	9,8 ± 0,5	0,033 ±
Bromuconazole (6 et 6')	9,7 ± 0,5 (378,0 → 159,0)	32 ± 2 (378,0 → 173,0)	6,5 ± 0,3	0,022 ±
Fluquinconazole (7)	17,6 ± 0,9 (376,0 → 348,8)	59 ± 3 (376,0 → 306,8)	11,7 ± 0,6	39 ± 2
Tétraconazole (8)	28 ± 1 (372,0 → 159,0)	94 ± 5 (372,0 → 205,0)	18,9 ± 0,9	63 ± 3
Tébuconazole (9)	12,3 ± 0,6 (308,2 → 70,0)	41 ± 2 (308,2 → 125,1)	8,2 ± 0,4	2,7 ± 0,1
Hexaconazole (10)	27 ± 1 (314,2 → 69,8)	90 ± 5 (314,2 → 159,0)	18,1 ± 0,9	60 ± 3
Prosulfocarbe (11)	29 ± 1 (252,3 → 128,1)	95 ± 5 (252,3 → 86,0)	19 ± 1	64 ± 3
OP ramifiés(12)	1900 ± 95 (205,2 → 133,1)	6340 ± 320 (205,2 → 133,1)	1270 ± 64	4200 ± 210
OP ₁ EO (13)	49 ± 2 (268,5 → 113,3)	164 ± 8 (268,5 → 139,2)	33 ± 2	109 ± 5
OP ₂ EO (14)	15,5 ± 0,8 (312,4 → 113,3)	52 ± 3 (312,4 → 183,1)	10,3 ± 0,5	34 ± 2
NP ramifiés (16)	1850 ± 93 (219,2 → 133,1)	6170 ± 310 (219,2 → 147,1)	1230 ± 62	4100 ± 210
4n-OP (17)	206 ± 10 (205,2 → 106,1)	685 ± 34 (205,2 → 106,1)	137 ± 7	46 ± 23
NP ₁ EO (18)	22 ± 1 (282,4 → 85,1)	74 ± 4 (282,4 → 138,9)	14,9 ± 0,7	50 ± 3
NP ₂ EO (19)	21 ± 1 (326,4 → 165,2)	69 ± 3 (326,4 → 89,1)	14,4 ± 0,7	50 ± 3
4n-NP (21)	205 ± 10 (219,2 → 106,1)	682 ± 34 (219,2 → 106,1)	137 ± 7	455 ± 23
Pyridabène (22)	14,7 ± 0,7 (365,3 → 147,1)	49 ± 2 (365,3 → 308,9)	9,8 ± 0,5	33 ± 2

Tableau 2-7 : Limites de Détection et de Quantification (LD et LQ) des composés obtenus en CPL-SM/SM à partir des effluents de STEP

Ces résultats montrent que les limites atteintes sont dans les normes fixées par l'Union Européenne inférieures à 0,1 ppb, sauf pour les APs non éthoxylés. Une possibilité d'atteindre des limites plus basses est d'augmenter le facteur de concentration qui sera envisagé lors de la préparation d'échantillon moins chargé que les effluents de STEP tel que les eaux souterraines.

II.2 Préparation d'échantillon et optimisation de l'extraction des 33 substances à partir des matrices aqueuses

1. Introduction

Une méthode d'analyse de traces et ultra-traces ne peut se concevoir sans un protocole de préparation rigoureux, reproductible et performant. La finalité de la préparation d'échantillon est de purifier et de concentrer les composés d'intérêt afin de les détecter par les techniques analytiques choisies. Plus précisément, pour les matrices aqueuses environnementales, il s'agit de filtrer et de conditionner l'échantillon avant de le concentrer et de le purifier.

2. Collecte de l'échantillon

Toutes les eaux collectées ont été mises dans des flacons préalablement nettoyés et rincés avec du méthanol et de l'acétone puis séchés sous hotte pendant 48 h.

Les échantillons d'effluents de station d'épuration sont des échantillons moyens, pris sur 24 heures, issus d'une des deux principales STation d'EPuration (STEP) du Grand Lyon, située à Saint-Fons. Cette station a une capacité de 1 037 000 équivalents habitants (un équivalent-habitant rejette en moyenne 200 litres d'eau et 90 g de matière organique par jour). Cette STEP traite en moyenne 207 000 m³ d'eaux usées par jour [41]. Elle reçoit une majorité d'eaux usées urbaines et une partie d'eaux usées industrielles (part < 15 %). Les échantillons d'eaux de surface et souterraines ont été collectées de mars à avril 2007 dans la région Rhône-Alpes. L'eau stagnante a été collectée sur le toit du laboratoire et recueillie après un orage. L'eau du Rhône a été collectée le 03 juin 2008 à 7 m de la berge et à 1 m de profondeur au niveau du village de Ternay (Rhône, France).

3. Filtration et conditionnement de la matrice

Une fois la collecte des eaux réalisée, elles subissent une première étape de préparation d'échantillon qui consiste en une filtration puis un conditionnement.

3.1. Evaluation de l'étape de filtration

Les eaux ont été filtrées sur un YT30 142 HW Millipore permettant une triple filtration de 1,5 L d'échantillon.



Figure 2-20 : Filtre Millipore YT30 142 HW

Ce filtre permettant de travailler sous pression est équipé d'un pré-filtre constitué de fibres de verre et de 2 filtres de porosités différentes, 8,0 μm et 0,45 μm . Cette étape est nécessaire pour éviter l'obstruction des cartouches d'extraction SPE par des matières en suspension. Des tests ont été effectués afin de vérifier si les filtres ne renaient pas les composés d'intérêt ou n'apportaient pas des

pollutions. Pour ce faire, nous avons analysé un volume d'eau UP dopé à hauteur des limites de détection de l'appareil pour chacun des analytes (cf tableau 2-7) avant et après filtration. La moyenne des taux de récupération calculés sur 3 manipulations entre l'eau dopée avant et l'eau dopée après filtration est de 85 %. Cette étape étant obligatoire avant extraction sur phase solide, nous avons validé cette étape au niveau de la préparation d'échantillon.

3.2. Conditionnement de l'échantillon

Dès lors que la méthode d'analyse a été mise au point nous avons testé le conditionnement et la conservation des effluents de STEP. En effet, il est indispensable de bien conserver l'échantillon en l'état jusqu'au moment de l'analyse.

Du fait du choix de nos molécules pour leur persistance dans l'environnement celles-ci ne doivent pas se dégrader rapidement, néanmoins ces expériences sont nécessaires dans le cadre d'une procédure de contrôle et de suivi des échantillons afin de connaître les possibilités de leur conservation.

Les effluents de STEP sont une matrice environnementale biologiquement active, il est donc nécessaire de connaître l'évolution des composés d'intérêt au sein de l'échantillon afin d'obtenir une analyse quantitative. Les travaux précédents ont montré que l'ajout d'un « conservateur » tel que l'ajout de formaldéhyde [42, 43], l'acidification de la matrice par l'acide chlorhydrique [44, 45], par l'acide sulfurique [21] ou par un acide faible [41] permettait d'obtenir une stabilité sur plusieurs jours [10]. De plus, la plupart des molécules choisies dans cette étude sont stables dans des conditions acide douces. L'acide formique est un acide couramment employé dans ce cas de figure [32, 41]. Cet acide est compatible avec un système de détection par spectrométrie de masse et son pKa est de 3,75. Nous avons donc choisi cet acide pour la suite de notre étude et ajusté le pH à 3,8.

Nous avons mené une série d'expériences afin d'évaluer l'évolution des concentrations en analytes sur plusieurs jours dans un échantillon d'effluents de STEP dopé aux limites de quantification des composés et conservé à l'abri de la lumière à 4°C. Pour ce faire nous avons calculé un taux exprimé en pourcentage et ramené à l'aire des composés détectés pour un échantillon extrait le jour du prélèvement, noté J0. L'acide formique a été ajouté à J0 de manière à ajuster le pH de l'échantillon (Effluents de STEP, pH initial \approx 8) à un pH de 3,5 [41]. Puis nous avons procédé à l'extraction à J+1, J+2, J+3, J+6, J+8 et J+10. Les résultats sont présentés dans le tableau 2-8. Les valeurs représentent le pourcentage de la quantité initiale à J0. Cette série d'expériences a été menée une fois l'optimisation des méthodes d'analyse par CPG-SM et CPL-SM et du protocole SPE faits. Elle a été répétée deux fois et le choix de la valeur du pH sera alors justifié dans le paragraphe 4.1.4 pour l'étape d'extraction par SPE.

Composés	J1	J2	J3	J6	J8	J10
2-Imidazolidinethione	82%	102%	105%	102%	105%	94%
Méthamidophos	97%	96%	97%	98%	94%	89%
Diméthoate	103%	97%	106%	108%	118%	108%
Propoxur	108%	110%	101%	107%	109%	117%
Diméthomorphe	99%	95%	94%	96%	104%	105%
Fluquinconazole	95%	99%	100%	100%	109%	108%
Tétraconazole	95%	99%	98%	98%	108%	109%
Bromuconazole	99%	97%	96%	92%	98%	93%
Tébuconazole	96%	97%	99%	101%	108%	106%
Hexaconazole	95%	92%	92%	95%	106%	107%
Prosulfocarbe	110%	113%	110%	113%	114%	116%
OP	109%	112%	110%	111%	104%	105%
OP ₁ EO	112%	111%	98%	108%	114%	113%
OP ₂ EO	102%	96%	93%	99%	106%	103%
OP ₃ EO	101%	102%	102%	104%	110%	106%
NP	105%	108%	98%	100%	100%	99%
NP ₁ EO	108%	104%	100%	105%	109%	103%
NP ₂ EO	103%	97%	94%	100%	105%	99%
NP ₃ EO	101%	97%	98%	104%	108%	101%
Pyridabène	102%	120%	106%	89%	99%	101%
4n-NP	109%	114%	111%	107%	102%	109%
4n-OP	111%	113%	112%	110%	117%	112%
DBP	96%	94%	96%	103%	100%	66%
o,p DDE	106%	101%	101%	106%	105%	69%
BA	85%	88%	113%	98%	110%	81%
p,p DDE	102%	104%	101%	79%	108%	70%
o,p DDD	101%	110%	107%	83%	109%	71%
p,p DDD	101%	106%	109%	101%	109%	70%
o,p DDT	102%	104%	92%	71%	99%	69%
p,p DDT	100%	101%	90%	73%	101%	66%
Méthoxychlore	99%	102%	106%	91%	115%	69%
DEHP	75%	95%	93%	59%	60%	62%
HPTE	101%	52%	35%	11%	14%	9%

**Tableau 2-8 : Etude de la stabilité des composés
dans un effluent de STEP à pH=3,5 conservé au noir à 4°C durant 10 jours**

On remarque la préservation des analytes jusqu'au huitième jour après le prélèvement, exception faite pour le HPTE qui se dégrade à hauteur de 48 % en deux jours. Les pesticides organochlorés ainsi que les phtalates et le bisphénol A ont été dégradés de plus de 30 % au dixième jour. Le reste des composés ne se dégrade pas ou faiblement. Les augmentations de certains pourcentages s'expliquent par les variations sur les étapes de SPE et sur l'appareillage qui s'additionnent et éventuellement par la conservation de l'activité bactériologique de matrice malgré l'acidification.

4. Optimisation de la SPE

La première étape dans la préparation des échantillons aqueux est une étape de préconcentration qui permet d'augmenter la concentration relative des substances à l'état de trace et ultratrace dans l'extrait à analyser.

La procédure d'extraction sur phase solide nécessite plusieurs étapes d'optimisation telles que le choix de la phase stationnaire, des solvants d'éluion, de la vitesse de chargement et de la quantité d'échantillon chargée sur la cartouche.

4.1. Extraction des analytes à partir de la matrice

Les APs sont des composés présents sur la liste des substances prioritaires de la DCE (cf Partie I) et sur la liste des substances et préparations dangereuses Annexe XVII du règlement REACH (cf Annexe IV). De plus ils sont considérés comme perturbateurs endocriniens. C'est pourquoi nous avons centré notre protocole d'extraction sur ces composés dans un premier temps.

En outre, toutes les étapes d'optimisation ont été réalisées sur des échantillons réels d'effluents de STEP. En effet, les valeurs des taux de récupération obtenus lors d'extractions d'eau UP dopée sont loin de la réalité. La charge de substances présentes dans une matrice environnementale est un facteur important à prendre en compte dans la saturation de la phase solide des cartouches SPE.

4.1.1. Sélection de la phase solide

L'extraction sur phase solide a d'abord été optimisée à partir de plusieurs phases qui ont été évaluées en calculant les taux de récupération des composés. Pour évaluer l'efficacité des phases solides, nous avons concentré une eau de STEP qui est dopée après extraction et une eau de STEP dopée avant extraction à une concentration de 500 ng.L⁻¹. Les taux de récupération sont calculés selon le rapport des aires obtenues pour l'échantillon dopé avant extraction sur les aires obtenues pour l'échantillon dopé après extraction. Les phases solides évaluées ont été :

- | | |
|---|---|
| - <i>Envi-Carb (200 mg, 3 cc, Supelco)</i> | <i>phase constituée de carbone graphite</i> |
| - <i>Starta-X (200 mg, 3 cc, Phenomenex)</i> | <i>phase polymère</i> |
| - <i>LC-18 (500 mg, 3 cc, Supelco)</i> | } <i>phase greffée C-18</i> |
| - <i>Bond Elut (500 mg, 3 cc, Varian)</i> | |
| - <i>Strata-C-18 (500 mg, 3 cc, Phenomenex)</i> | |

Le protocole mis en place pour comparer les phases solides a consisté en :

||| **Conditionnement : 5 mL de méthanol, 5 mL d'eau UP**

||| **Chargement de l'échantillon : 500 mL d'effluents de STEP à 5 mL.min⁻¹**

||| **Elution : 10 mL de méthanol à 1 mL.min⁻¹**

Dans un premier temps, le méthanol a été choisi comme solvant polaire grâce à ses propriétés élevées de force éluante et de basse température d'ébullition facilitant la concentration de la fraction

obtenue lors de l'évaporation (cf Annexe X). Les valeurs des taux de récupération calculées, appelées aussi rendements, sont présentées sur la figure 2-21.

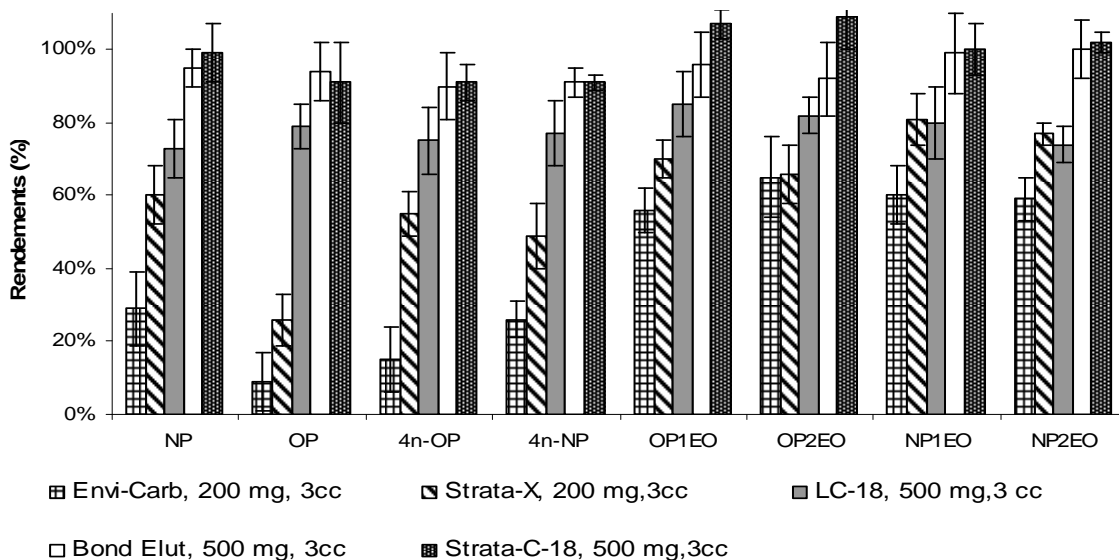


Figure 2-21 : Taux de récupération des APs et APEOs en fonction de la phase solide

On constate que la phase constituée de carbone graphite n'est pas adaptée à l'extraction des APs, il s'agit d'une phase qui est prévue pour les petites molécules et les molécules polaires. On peut supposer que les nombreuses petites molécules considérées comme des interférents de la matrice satureront rapidement les sites d'adsorption du carbone graphite, empêchant leur accessibilité par les analytes recherchés.

La phase polymère, Strata-X, donne des taux de recouvrements plus élevés que sur le carbone graphite mais ce sont avec des phases composées de silice greffée C-18 que nous obtenons les meilleurs résultats et plus particulièrement avec la phase commerciale Strata-C-18. Les taux varient alors de 91 à 100%. La phase Strata-C-18 a été choisie pour le reste de l'étude.

4.1.2. Vitesse et volume d'échantillon chargés en SPE

Le débit des différentes étapes ainsi que la quantité d'échantillon chargée sur la phase solide sont deux critères importants qu'il est nécessaire d'évaluer dans le cadre d'une matrice aqueuse environnementale.

4.1.2.1. Volume d'échantillon en SPE

Le volume d'échantillon est un paramètre important dans la mise au point d'une étape de préconcentration par SPE. En effet, une matrice complexe peut surcharger la phase solide et empêcher l'accessibilité des molécules d'intérêt aux sites d'adsorption déjà occupés par d'autres molécules. Il s'en suit une élution des analytes lors de l'étape de chargement de l'échantillon qui ne peuvent plus accéder aux sites d'adsorption occupés par les interférents. Cette étape d'évaluation du volume de charge a été réalisée sur un effluent « réel » de STEP avec le même protocole que celui

détaillé pour l'évaluation des phases solides. La phase solide est une Strata-C-18, 500mg, et la vitesse de chargement a été réglée à 4 mLmin⁻¹. Les résultats sont donnés dans le tableau 2-9. A ce stade de l'étude nous avons ajouté aux APs, quelques pesticides, tels que les OCPs et les autres PEs industriels (bisphénol A et dibutylphtalate).

Composés	V _{charge} = 300 mL	V _{charge} = 500 mL
NP	97%	52%
OP	95%	53%
4n-NP	90%	55%
4n-OP	89%	51%
OP ₁ EO	105%	50%
OP ₂ EO	101%	52%
NP ₁ EO	102%	67%
NP ₂ EO	109%	61%
Propoxur	101%	59%
Méthoxychlore	91%	42%
HPTE	102%	47%
o,p-DDD	99%	40%
p,p-DDD	105%	36%
o,p-DDE	105%	40%
p,p-DDE	81%	38%
o,p-DDT	81%	33%
p,p-DDT	64%	33%
Bisphénol A	95%	82%
Dibutylphtalate	112%	78%

Tableau 2-9 : Taux de récupération obtenus pour deux volumes de charge, 300 et 500 mL d'un même effluent de STEP

Ces résultats nous montrent que le volume de charge a un effet important sur les rendements de la SPE. Il est préférable d'employer 300 mL d'échantillon d'effluent de STEP sur une cartouche qui contient 500 mg de phase solide Strata-C-18. Le volume d'échantillon de la méthode SPE est fixé à 300 mL.

En ce qui concerne les nouveaux composés ajoutés à ce stade de l'étude, nous observons de taux de récupération intéressants avec le protocole déjà établi sur les APs avec des taux variant de 64 à 112%.

4.1.2.2. Vitesse de charge en SPE

La vitesse de charge est également un élément important dans un protocole SPE. Il est courant d'employer des vitesses de charge de l'ordre de 1 à 5 mL.min⁻¹. Nous avons pour cela testé deux vitesses sur 500 mg, Strata-C-18, dans les mêmes conditions de protocole que pour l'évaluation des phases solides (cf § 4.1.1.). Le volume d'échantillon chargé a été de 300 mL. Les résultats obtenus regroupés dans le tableau 2-10.

Composés	4 mL.min ⁻¹	1 mL.min ⁻¹
NP	99%	72%
OP	91%	88%
4n-NP	91%	80%
4n-OP	91%	89%
OP ₁ EO	107%	79%
OP ₂ EO	109%	78%
NP ₁ EO	100%	85%
NP ₂ EO	102%	64%
Propoxur	115%	95%
Méthoxychlore	86%	89%
HPTE	107%	103%
o,p-DDD	96%	61%
p,p-DDD	116%	55%
o,p-DDE	109%	48%
p,p-DDE	84%	53%
o,p-DDT	72%	59%
p,p-DDT	60%	69%
Bisphénol A	92%	97%
Dibutylphtalate	108%	96%

Tableau 2-10 : Taux de récupération pour deux vitesses de charge de l'échantillon sur une cartouche de 500 mg Strata-C-18 en SPE

On remarque qu'une diminution de la vitesse de chargement de l'échantillon sur la phase solide (500 mg, Strata-C-18) est néfaste au rendement de l'étape de concentration. Ceci est dû à la cinétique d'équilibre entre la matrice de l'échantillon et la capacité de rétention de la phase solide. Nous optons pour le reste de l'étude pour une vitesse de charge de 4 mL.min⁻¹.

4.1.3. Choix des solvants d'élution

Le solvant d'élution doit posséder une caractéristique essentielle, celle d'avoir une force éluante suffisante pour pouvoir solvater les molécules d'intérêt et celle de ne pas solubiliser les interférents. Le méthanol possède une force éluante beaucoup trop forte et permet d'éluer beaucoup d'interférents de la matrice qui ont été retenus sur la phase solide lors de la phase de charge. Nous avons donc décidé d'évaluer quatre solvants en plus du méthanol : l'acétone, le dichlorométhane, l'acétonitrile et l'acétate d'éthyle. Cette étape de l'optimisation du protocole SPE a été conduite en grande partie pour l'optimisation de l'extraction des pesticides organochlorés pour qui les rendements sont les plus faibles à ce stade de l'étude.

Nous avons procédé à l'extraction d'une eau de STEP dopée puis en faisant varier le solvant d'élution nous avons comparé les différentes fractions obtenues avec le méthanol, solvant d'élution choisi d'après la bibliographie [31, 44, 46]. Le débit a été fixé à 1 mL.min⁻¹, débit permettant d'éluer progressivement les solutés par un équilibre liquide↔solide lent. Le volume du solvant d'élution étudié est fixé à 5 mL. Nous avons calculé le ratio des aires obtenus avec les solvants choisis en

comparaison avec les aires obtenus pour une élution au méthanol. Ceci nous a donné les pourcentages présentés dans le tableau 2-11.

Composés	Méthanol	Acétone	Dichlorométhane	Acétate d'éthyle	Acétonitrile
Propoxur	100%	101%	15%	147%	0%
Diméthoate	100%	150%	43%	135%	64%
o,p DDE	100%	104%	34%	187%	0%
p,p DDE	100%	121%	50%	172%	0%
o,p DDD	100%	132%	60%	164%	7%
p,p DDD	100%	138%	73%	159%	19%
o,p DDT	100%	141%	59%	167%	16%
p,p DDT	100%	145%	70%	168%	28%
Méthoxychlore	100%	143%	87%	159%	77%

Tableau 2-11 : Pourcentages des ratios des aires obtenus avec l'acétone, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et l'acétonitrile avec comme référence une élution au méthanol

Nous pouvons constater que le dichlorométhane et l'acétonitrile permettent d'éluer entre 0 et 87% de la quantité d'analytes élués grâce au méthanol, tandis que l'acétate d'éthyle et l'acétone permettent d'éluer fortement les composés de la phase solide et augmentent la proportion des analytes dans la fraction récupérée jusqu'à 1,8 fois. Nous avons choisi de procéder à une collecte de deux fractions par suite de l'ajout de nouvelles substances à notre méthode d'analyse, telles que les fongicides. La première collection de fraction est réalisée grâce à l'acétone puis la deuxième avec l'acétate d'éthyle, cet ordre a été dicté par la miscibilité de l'eau résiduelle présente sur la phase de la cartouche et l'acétone. L'acétate d'éthyle permet ainsi en deuxième collection de compléter l'élution des composés. La deuxième fraction permet de récupérer entre 2 et 5% de plus de composés et jusqu'à 18% pour le 2-imidazolidinethione.

4.1.4. Choix du pH de l'échantillon et impact sur la SPE

Comme nous l'avons évoqué dans le paragraphe 3.2., l'emploi d'acide formique a été choisi et validé en tant que « conservateur » d'analytes dans une matrice biologiquement active. Nous avons expérimenté la valeur optimale du pH et son impact sur l'étape de concentration par SPE. Nous avons sélectionné 4 valeurs de pH, 3,8 ; 4,7 ; 5,7 et 7,8 ajustées avec de l'acide formique (ajout inférieur à 2 ‰ en volume). Cette dernière valeur de pH est la valeur moyenne rencontrée dans les effluents de STEP bruts. Les résultats obtenus pour les rendements SPE de chaque composé quantifié sont donnés sur la figure 2-22.

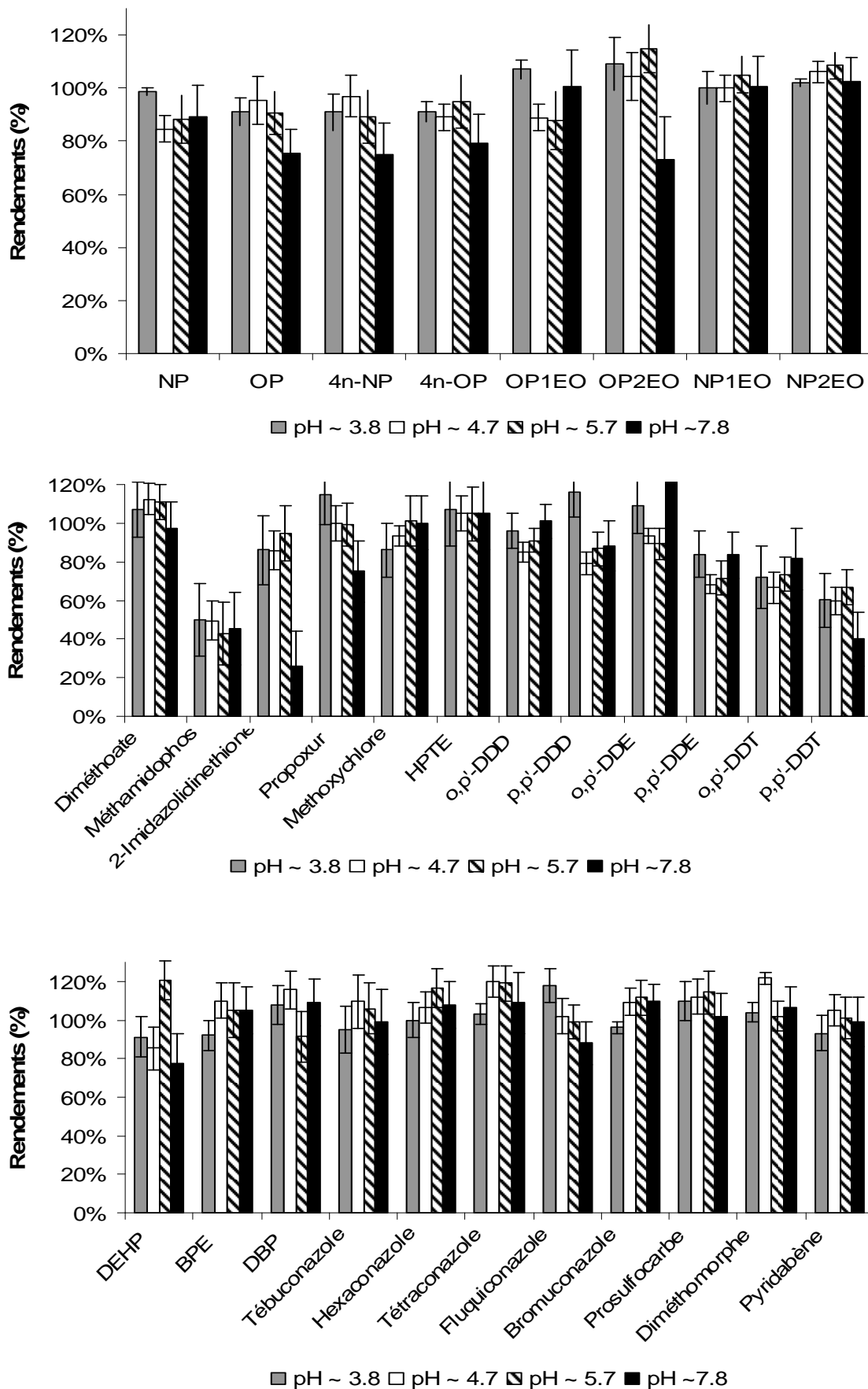


Figure 2-22 : Rendements SPE obtenus en fonction du pH de l'échantillon

Cette expérience nous permet de constater une plus forte variation dans les rendements obtenus sans ajout d'acide formique, déviation standard par rapport à la moyenne compris entre 9 et 19%. Tandis que les variations sur les rendements obtenus pour un pH de 3,8 sont acceptables, 6% en moyenne. De plus, la valeur du pH semble avoir un effet sur l'extraction de certains composés et un pH de 3,8 est préférable pour des molécules telles que le méthamidophos, les pesticides organochlorés en général ainsi que les alkylphénols. Les fongicides paraissent quant à eux peu sensibles au pH de l'échantillon. Pour la suite de l'étude le pH des échantillons aqueux, effluents et eaux de surface ou souterraines sera ajusté à un pH de 3,8 à l'aide d'acide formique.

4.1.5. Protocole SPE optimisé

Suite à ces étapes d'optimisation le protocole SPE retenu est mené sur une cartouche Strata C-18 de 500 mg de phase solide en format 3cc :

Conditionnement : 5 mL de méthanol à 4 mL.min⁻¹

5 mL d'eau UP à 4 mL.min⁻¹

Chargement de l'échantillon : 300 mL d'échantillon aqueux acidifié à pH=3,8 par l'acide formique à 4 mL.min⁻¹

Elution : 10 mL d'acétone à 1 mL.min⁻¹

10 mL d'acétate d'éthyle à 1 mL.min⁻¹

Suite à l'obtention de deux fractions collectées dans deux tubes de 11 mL, celles-ci sont rassemblées et évaporées à environ 200 µL. Puis 1 mL d'un mélange de solvants apolaire/polaire est ajouté afin de réaliser une étape de purification sur silice en phase normale qui est détaillée dans le paragraphe suivant.

4.2. Purification de l'extrait obtenu

La première étape de SPE mise au point a pour but de concentrer les analytes avec un minimum d'interférents. Néanmoins, l'élution des analytes peut entraîner celle d'interférents ayant des propriétés similaires, nous avons donc expérimenté une étape de purification par SPE en phase normale sur silice. Pour ce faire, nous avons repris un protocole proposé par Vuillet et al. [41]. Dans ce contexte de purification d'extrait, nous souhaitons procéder à la rétention des interférents sur la phase solide tout en conservant en phase solvant les analytes qui collectés lors du chargement de l'extrait.

Une solution d'étalon contenant les 33 composés dans un mélange heptane/acétone (**3/7**, v/v) est déposé sur une phase solide SiOH (500 mg, 3 cc, Phenomenex) et la phase solvant recueillie. Un passage de 3 mL heptane/acétone (**3/7**, v/v) est collecté pour attester de l'élution complète des composés d'intérêt. Les 2 fractions sont rassemblées et évaporées puis analysées. Les taux de récupération totaux sont très satisfaisants et compris entre 96 et 100 % pour cette seule étape. De plus l'extrait obtenu après purification est beaucoup moins coloré que l'extrait obtenu directement après l'étape de concentration seule, ce qui tend à prouver la rétention des substances humiques

concentrées avec les analytes lors de la première étape de SPE. Un mélange hexane/acétone (3/7, v/v) a également été évalué et nous donne des taux de recouvrements plus faibles pour les nonylphénols, 76 % en moyenne.

Ainsi, nous avons donc choisi le protocole suivant :

Conditionnement : 5 mL de heptane/acétone (3/7, v/v) à 4 mL.min⁻¹

Chargement de l'échantillon et collecte : ≈ 1 mL d'extrait à 1 mL.min⁻¹

Collecte additionnelle : 3 mL de heptane/acétone (3/7, v/v) à 1 mL.min⁻¹

Les fractions sont concentrées par évaporation dont le résidu sec est repris par 200 µL de THF.

5. Evaluation du tiers solvant

Les étapes de SPE sont suivies d'évaporations à température douce, 35°C, sous un flux d'azote. Compte tenu des valeurs de pression de vapeur saturante des composés étudiés, notamment les carbamates et organophosphorés, nous nous sommes intéressés à employer un tiers solvant. Le tableau 2-12 présente les composés dont la tension de vapeur est supérieure à 1 mm de Hg. Aucune donnée sur la pression de vapeur saturante des alkylphénols n'a été relatée dans la littérature, néanmoins on peut estimer leurs valeurs inférieures à 0,01 mPa, (1 mm Hg = 133.3 Pa).

	Pression de vapeur saturante (en mPa)	Température (°C)	Pertes lors de l'évaporation
Carbamates et organophosphorés			
Méthamidophos	2,3 (a)	20	22 %
2-Imidazolidinethione	13300 (a)	25	27 %
Propoxur	1,3 (a)	25	17 %
Prosulfocarbe	6,9 (b)	25	24 %

Tableau 2-12 : Pressions de vapeur saturante pour les composés analysés, (a) [47] et (b) [48], pertes évaluées lors de l'évaporation d'une solution étalon (isopropanol)

En effet, nous avons constaté que certains de nos composés sont relativement volatils et des pertes d'analytes ont été relevées. Une solution étalon a été évaporée puis comparée à un mélange de composition identique n'ayant pas subi d'évaporation. Les pertes calculées sont comprises entre 0 et 27 %, tableau 2-12.

Le but du tiers solvant est de conserver les analytes lors de l'étape d'évaporation-concentration. Il s'agit donc de sélectionner un solvant qui possède une température d'ébullition haute ainsi qu'une pression de vapeur très faible. Parmi ceux couramment utilisés, nous avons noté, le DiMéthylSulfOxyde (DMSO), le DiMéthylFormamide (DMF), le dodécane, le DiMéthylAcétamide (DMAc) et le glycérol.

Composés	Pression de vapeur saturante (mPa)
DMSO	56 000
DMF	360 000
Dodécane	40 000
DMAc	266 644
Glycérol	< 133 322

Tableau 2-13 : Pressions de vapeur saturante pour les tiers solvants évalués à 20°C

Nous avons évalué ces 5 composés en réalisant des évaporations de mélanges étalons avec un volume identique de tiers solvant et sans ajout de tiers solvant. Nous avons abouti rapidement à la sélection du glycérol. En effet, au bout d'une heure d'évaporation à 35°C sous un doux flux d'azote, les 25 µL de DMSO, le dodécane, le DMAc et le DMF se sont vaporisés, seul le glycérol ne varie pas en volume pendant plus d'une heure et est stable chimiquement. L'expérience a été menée avec suivi du poids du tube. Les pertes lors de l'évaporation évaluées en présence de glycérol sont résumées dans le tableau 2-14.

Composés	Pertes lors de l'évaporation en présence de glycérol (%)
Méthamidophos	12 %
2-Imidazolidinethione	12 %
Propoxur	16 %
Prosulfocarbe	10 %

Tableau 2- 14 : Evaluation des pertes lors des étapes d'évaporation avec glycérol

On constate que le glycérol permet de conserver les quatre analytes les plus volatils. Nous avons constaté une perte d'environ 5 à 10 % sur les autres composés. Pour des facilités de pipetage nous avons choisi de prélever une solution aqueuse de glycérol beaucoup moins visqueuse que le glycérol pur, avec un mélange 1/1 en poids Eau UP/glycérol. Comme nous l'avons indiqué au paragraphe 3.2.2.5., partie II.2., la présence d'eau dans l'échantillon améliore la symétrie des pics en CPL, il est donc intéressant d'en apporter dans l'extrait à injecter.

Finalement, le mélange d'extrait obtenu après SPE et après évaporation est composé de glycérol, THF et d'eau UP. Il reste donc à déterminer les proportions de chaque constituant.

- 1) Le volume total d'échantillon extrait recherché est fixé à 200 µL, volume suffisant pour analyser l'extrait à la fois en CPG et en CPG.
- 2) Il faut également que la teneur en tiers solvant n'excède pas 20 % du volume total, afin que le processus de désolvatation des gouttelettes de l'échantillon se déroule correctement lors de la formation de l'électrospray. Un volume maximum de 50 µL de glycérol est donc admis.
- 3) Il faut que le mélange ternaire eau UP/THF/glycérol soit miscible

Des essais ont été réalisés sur différentes proportions en glycérol, 25 et 50 µL avec 125 et 150 µL de THF. Ces mélanges sont insolubles. Nous avons alors testé des ajouts d'eau et nous avons observé que l'ajout de 50 µL d'eau UP dans 25 µL de glycérol avec 125 µL de THF donne un extrait homogène, ce sera notre composition d'échantillon permettant un facteur de concentration de 1500 fois.

II.3 Choix de la procédure de quantification et application de la méthode à des eaux environnementales

1. Introduction

Après le choix du prétraitement, de l'extraction de l'échantillon, des conditions chromatographiques et de la détection, nous avons mis au point une méthode de quantification qui est l'étape ultime de notre méthode d'analyse.

La quantification des espèces chimiques par chromatographie nécessite des courbes d'étalonnage basées sur la relation reliant l'aire du composé élué à la quantité de matière injectée. Elle permet de déterminer la concentration de l'échantillon analysé, avec certains degrés de justesse et de précision.

Ainsi, l'analyse quantitative repose essentiellement sur trois méthodes :

- l'étalonnage interne
- l'étalonnage externe
- les ajouts dosés

Ces trois méthodes possèdent des caractéristiques qui leur sont propres. Dans le cas de l'analyse environnementale, des interférents peuvent influencer sur le signal et conduire à la quantification incorrecte de certains composés. Il s'agit donc d'évaluer l'effet de matrice et de choisir la méthode de quantification adaptée aux composés sélectionnés.

2. Quantification en analyse environnementale

Plus précisément, dans le cadre de notre projet, nous devons construire une méthode de quantification juste et robuste pour détecter des traces et ultra-traces de substances chimiques. Pour une substance qui est présente à l'état de trace dans la matrice la concentration varie du milligramme par kilogramme (mg.kg^{-1}) au microgramme par kilogramme ($\mu\text{g.kg}^{-1}$), au-dessous il faut parler d'ultratraces ou de nanogramme par kilogramme (ng.kg^{-1}). Suivant les résultats obtenus par des précédents auteurs (cf Etude bibliographique, Partie I), nous devons quantifier à la fois des ultratraces ainsi que des traces de polluants. Il convient donc de choisir un mode d'étalonnage adapté à cette différence de concentrations.

2.1. *Evaluation de l'effet de matrice*

Pour décider du choix de la méthode d'étalonnage adaptée à notre méthode d'analyse, nous avons évalué l'effet de matrice engendré par les effluents de STEP.

Un effet de matrice se détermine à partir de la comparaison de la réponse de chaque analyte présent dans un solvant pur et dans la matrice. Pour procéder à cette étude, nous avons utilisé un extrait d'effluents de STEP collecté après extraction sur phase solide et purification dopé à une concentration connue juste avant analyse (produisant l'aire A_s) et un extrait du même effluent de STEP non dopé (engendrant l'aire A_x). Le calcul de la différence de signal entre ces deux extraits nous permet d'accéder à l'aire associée à l'ajout d'analytes de concentration connue, car il est impossible d'obtenir une matrice blanche avec ce type d'échantillon. Enfin cette différence est comparée au signal obtenu par une solution pure d'étalons de concentration identique à l'ajout fait dans la matrice (noté A_d).

L'augmentation ou la diminution du signal se calcule grâce à l'équation 2-4 ci-dessous :

$$\text{Suppression/augmentation de signal} = \left[\frac{(As - Ax)}{Ad} \right]$$

Équation 2-4 : Equation du calcul de l'effet de matrice [49]

Une valeur positive se traduit par une augmentation du signal, une valeur négative représente une atténuation du signal appelée suppression d'ion. Les valeurs calculées sont présentées sur la figure 2-23. Les composés qui présentent un astérisque et avec des barres rayées sont les composés analysés par CPG-SM.

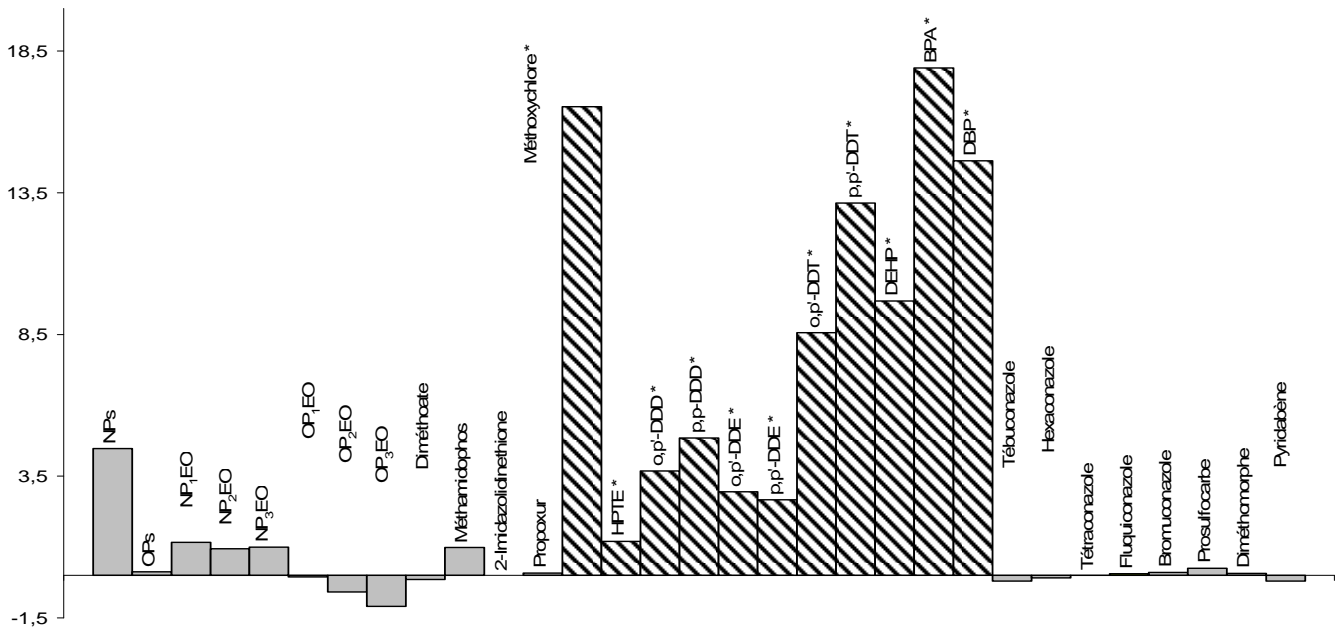


Figure 2-23 : Effet de matrice évalué sur un effluent de STEP

A la vue de ces données calculées, on constate un fort effet de matrice principalement sur les pesticides organochlorés, les phtalates et le bisphénol A et qui est compris entre 1,2 et 17,9. Ces composés sont analysés par CPG-SM, l'effet de matrice est certainement à corréliser avec le système analytique employé. En effet, certains auteurs [50] expliquent cette augmentation de signal en CPG-SM par le blocage des sites actifs de l'injecteur produisant une augmentation de l'efficacité d'introduction des analytes dans la colonne. Pour les composés analysés par CPL-SM/SM, on remarque un faible effet de matrice pour les fongicides et les carbamates et un effet plus fort pour les NPs (4,5), les AP_nEOs et le méthamidophos ($\approx \pm 1$). On peut expliquer ces effets par deux raisons, l'un sur la séparation chromatographique, l'autre sur les phénomènes se faisant au sein de l'électrospray et de la source.

D'une part, les effets sur la séparation chromatographique sont liés aux phénomènes d'exclusion stérique qui peuvent se dérouler au sein de la phase stationnaire. Les interférents d'une matrice environnementale aqueuse sont représentés en partie par les acides humiques et/ou les tanins qui sont des molécules de poids élevés. Les tanins sont des polyphénols dont la masse molaire est

comprise entre 500 et 3000 g.mol⁻¹, ils sont parfois liés à des protéines. Les acides humiques sont des polymères à haut poids moléculaire (50000-100000 g.mol⁻¹) et sont constitués de noyaux aromatiques reliés par des chaînes aliphatiques et présentant des groupements fonctionnels à caractère acide. Ce type d'interférents retarde l'accès d'une partie des analytes aux sites de la phase stationnaire et entraîne une coélution de plusieurs composés (analytes + interférents) [51]. De plus, leur large gamme de poids moléculaire peut engendrer une augmentation du signal des analytes.

D'autre part, dans le cas des OPnEOs, on constate une diminution du signal en présence de matrice extraite. Ceci s'explique par des phénomènes qui se déroulent lors du processus d'électrospray. Un changement sur l'efficacité d'ionisation se produit à cause de la compétition qui a lieu entre les composants de la matrice et les analytes pour atteindre la surface de la gouttelette [52].

2.2. Méthodes d'étalonnage

2.2.1. Etalonnage externe

L'étalonnage direct est la méthode la plus simple. Cependant, elle n'est pas universelle. Il faut pour cela préparer des solutions standards des analytes à diverses concentrations. La concentration des échantillons dépend du protocole de préparation et des limitations de l'appareillage (saturation, limite de sensibilité). Pour une précision optimale, l'inconnu doit être au centre de la courbe d'étalonnage, la région la plus précise de la courbe. Le signal mesuré est tracé en fonction de la concentration. Le signal détecté doit être linéaire avec la concentration pour utiliser cette méthode. Cette méthode ne corrige pas les erreurs de volumes et est très affectée par les effets matrices possibles.

2.2.2. Etalonnage interne

Cette méthode permet de s'affranchir des erreurs commises par l'expérimentateur et celle de l'appareillage (volume injecté, état de la colonne chromatographie et du détecteur) en ajoutant à toutes les solutions analysées un même constituant de concentration connue qui n'interfère avec aucun des constituants présents dans l'échantillon. Les taux de recouvrement affectent de la même manière l'étalon interne et tous les analytes et les pertes seront proportionnellement identiques pour tous les composés. En utilisant le quotient de l'analyte et de l'étalon interne on obtient un signal directement proportionnel à la concentration. Pour répondre à ces critères, l'étalon interne doit satisfaire plusieurs critères, tels qu'un temps de rétention différent de tous les autres composés mais le plus proche possible de la substance à analyser, être absent de l'échantillon, avoir un coefficient de réponse du même ordre de grandeur que celui du composé à quantifier et enfin il faut qu'il soit ajouté à une concentration qui donne une aire de pic sensiblement équivalente à celle du produit à déterminer. On se rend bien compte que dans le cas des analyses de matrices complexes, il devient extrêmement difficile d'utiliser cette méthode. Dans le cas d'une méthode d'analyse multifamilles, il serait nécessaire d'utiliser un étalon interne pour chaque famille de molécules, ce qui ne permet pas d'envisager un tel étalonnage.

2.2.3. Ajouts dosés

Parfois, la matrice de l'échantillon modifie le coefficient de réponse et cause une interférence avec la mesure des molécules recherchées. Cet effet peut diminuer le signal en modifiant le rendement du détecteur, ou au contraire augmenter le signal par la présence des interférents, c'est l'effet de matrice. Ainsi on constate que la réponse est différente pour une même concentration d'analyte dans une solution standard et un échantillon. Dans la méthode des ajouts dosés, on utilise l'échantillon lui-même comme matrice pour l'étalonnage, pour compenser les effets de matrice. On utilise donc une courbe d'étalonnage qui est tracée en réalisant des ajouts de quantités d'analytes de concentration parfaitement connue sans modification du volume de l'échantillon. L'accroissement de l'aire de chaque composé entre deux analyses est lié à l'ajout et permet de déterminer la quantité initiale de chaque soluté. La courbe d'étalonnage est du type :

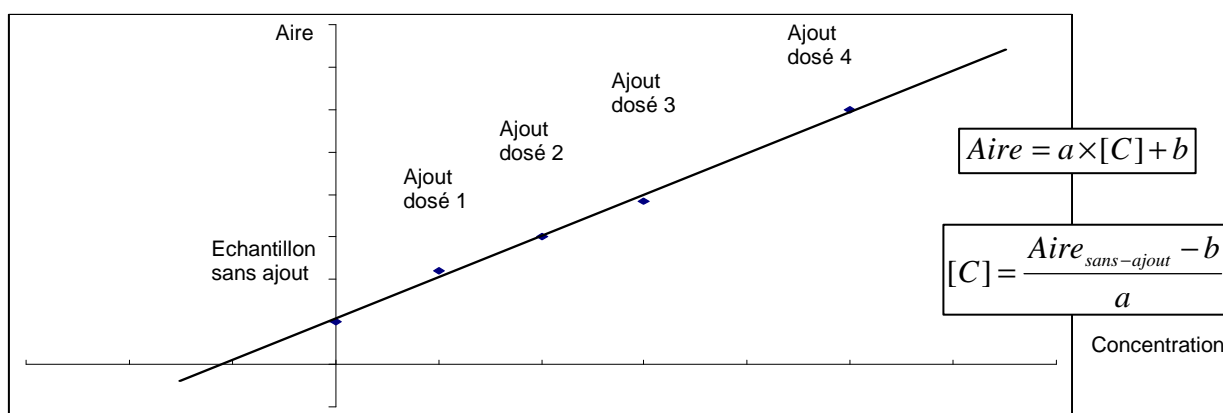


Figure 2-24 : Courbe d'étalonnage type obtenue lors d'ajouts dosés

Cette méthode présente un intérêt considérable pour l'analyse des traces et ultra-traces de substances dans des matrices complexes telles que les matrices environnementales.

2.3. Méthode des ajouts dosés appliquée au protocole

Il existe deux manières d'aborder la méthode des ajouts dosés dans le cadre de notre protocole, soit d'effectuer l'ajout dans le vial d'injection, soit de faire les ajouts dès le début du traitement de l'échantillon. Pour tenir compte de tous effets que les analytes peuvent subir durant les étapes de préparation d'échantillon, nous avons dopé les effluents de STEP juste après l'étape de filtration. Les effluents de STEP contiennent de nombreuses particules en suspension (Matières En Suspension, MES) et notre méthode d'analyse considère uniquement la partie aqueuse de cette matrice, nous avons donc procédé aux ajouts après filtration pour éviter leur adsorption sur les MES et biaiser l'étalonnage. 5 ajouts ont permis de réaliser une courbe d'étalonnage avec des coefficients de corrélation de 0,99 minimum (cf annexe XI).

3. Validation de la méthode

La validation d'une méthode analytique est une démarche qui permet de démontrer que les résultats obtenus par cette méthode sont fiables, reproductibles et que la méthode est adaptée aux conditions préconisées et recherchées. Une des premières étapes de la validation est de trouver les limites du domaine de linéarité puis de valider ces limites par une étude statistique.

3.1. Linéarité de la méthode

La linéarité d'une méthode consiste à définir le domaine de concentration sur lequel on peut affirmer que la quantification des analytes est fiable avec un faible risque d'erreur selon l'équation de la droite de régression utile à l'étalonnage $y=ax+b$. Si on observe une courbure de cette droite, il sera indispensable de réduire la gamme étalon de façon à obtenir un véritable domaine de linéarité.

La linéarité de la méthode pour les 33 composés a été vérifiée sur 5 niveaux de concentrations répétés chacun 8 fois.

La méthode que nous avons employée pour réaliser cette vérification utilise la méthode des moindres carrés basée sur l'analyse de la variance. Il s'agit de décomposer la somme des carrés des écarts des réponses, notée SCEy, suivant l'équation :

$$SCEy = SCE_{reg} + SCE_{em} + SCE_e$$

SCE_{reg} représente la somme des carrés des écarts due à la régression, SCE_{em} celle due à une erreur du modèle et SCE_e désigne la somme des carrés des écarts due à l'erreur pure. Le principe du test consiste à vérifier que la part de la variance due à l'erreur de modèle n'est pas supérieure à la variance de l'erreur expérimentale. Ainsi on construit un tableau ANOVA (Analyse de la variance) qui permet d'accéder au F de Fisher calculé selon la formule :

$$F_{reg} = V_{reg}/V_e \text{ et } F_{em} = V_{em}/V_e$$

Avec :

- V_{reg} : variance de régression calculée comme le quotient de la SCE_{reg} sur le degré de liberté de la régression linéaire soit 1,
- V_e , variance de l'erreur pure calculée comme le quotient de la SCE_e sur le degré de liberté résiduel (nombre de réponse – le nombre de niveaux),
- V_{em} , variance de l'erreur du modèle calculée comme le quotient de la SCE_{em} sur le degré de liberté du modèle (nombre de niveaux – 2).

Les critères de validation sont :

$F_{reg} > \text{limite } F_{reg}$ au risque de 5 % signifie que x et y sont bien liés,

$F_{em} < \text{limite } F_{em}$ au risque de 5 % signifie que le modèle linéaire est acceptable.

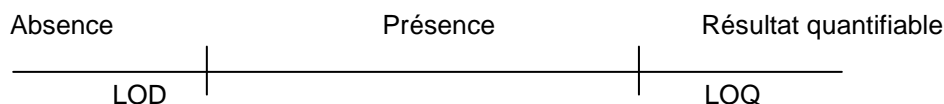
Dans le protocole de validation, le coefficient limite F_{reg} est égal à 4,121 (probabilité de 0,05 à 1 et 35 de degrés de liberté) et limite F_{em} est égal à 2,874 (probabilité de 0,05 à 3 et 35 degrés de liberté).

Les critères de validation remplis, les résultats sont donnés en annexe XI.

3.2. Validation des limites de détection et de quantification de la méthode

Pour effectuer une partie de la validation de la méthode analytique, et plus particulièrement pour valider les limites de détection et de quantification des 33 composés, nous avons calculé deux valeurs basées sur les équations 2-5.

La première phase de la méthodologie consiste à estimer les limites théoriques suivant l'équation 2-1, ce qui définit 3 zones qui peuvent être schématisées de la façon suivante :



Ceci, nous a permis d'obtenir les limites de détection présentées dans les tableaux 2-2 et 2-7.

Puis lors d'une deuxième phase, nous nous sommes assurés que sur 10 mesures d'un extrait dopé à une concentration aussi proche que possible de la LQ, les deux inégalités suivantes sont vérifiées :

$$\left| \frac{LQ_v - \overline{uLQ}}{SLQ / \sqrt{n}} \right| < 10$$

Equation 1

$$LQ_v - 10 * SLQ > 0$$

Equation 2

LQ_v : concentration théorique des étalons mesurée

uLQ : moyenne des réponses obtenues (en unités de concentration)

SLQ : écart type estimé des 10 réponses

n : nombre de mesures (ici, 10)

Équation 2-5 : Equations utilisées pour la validation des limites de détection et de quantification

Les critères de validation sont vérifiés si les deux inégalités sont vérifiées et la limite de quantification est alors égale à LQ_v. Les limites obtenues pour les composés analysés par CPL-SM/SM ont été validées mais pas celles obtenues par CPG-SM. Ceci peut s'expliquer par le plus fort effet de matrice pour les résultats obtenus par CPG.

4. Application de la méthode sur des échantillons réels

Les échantillons de la région Rhône-Alpes analysés ont été :

- 5 effluents de STEP qui représentent une moyenne sur la journée, prélevés entre le 1^{er} mars 2007 et le 09 juillet 2007
- eau potable et eau industrielle du laboratoire
- 3 eaux souterraines
- 4 eaux de surface et 2 eaux traitées provenant de petites stations de traitement d'effluents domestiques
- un échantillon d'eau du Rhône et d'eau de pluie

Pour rappel, les dispositions réglementaires en matière d'eau potable, en application des directives Européennes 98/83/CE et 75/440/CEE, fixent les teneurs résumées dans le tableau 2-15.

Dans les ressources en eau	Au robinet du consommateur
2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour chaque pesticide	0,10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour chaque pesticide
5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour le total des substances mesurées	0,50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour le total des substances mesurées

Tableau 2-15 : Seuils limites réglementaires des teneurs en pesticides pour des eaux destinées à la consommation

En ce qui concerne la qualité des eaux superficielles et eaux souterraines, le dépassement du seuil fixé à 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ d'un pesticide considéré permet de dire que l'eau est de mauvaise qualité, inférieur à 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ l'eau est de très bonne qualité (décret du 30 décembre 2001). Les classes de qualité environnementales des eaux sont résumées dans le tableau 2-16.

Classe	Très bonne qualité		Bonne		Moyenne		Médiocre		Mauvaise
Seuil en $\mu\text{g.L}^{-1}$ par pesticide identifié		0,1		0,7		1,4		2	
Seuil $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour la somme des pesticides		0,5		2		3,5		5	

Tableau 2-16 : Classe de qualité environnementale réglementaire concernant les pesticides

De plus, l'annexe VI permet de situer les concentrations mesurées dans l'environnement Rhône-Alpin par rapport à d'autres sites géographiques de prélèvement. Néanmoins il est délicat de fournir des comparaisons rigoureuses car il est nécessaire de prendre en compte les conditions du milieu (traitements agricoles, saisons, météo).

Les résultats obtenus sont donnés en annexe XII en ppb ou $\mu\text{g.L}^{-1}$. Les cases grisées représentent les composés détectés mais non quantifiés. Dans les paragraphes qui suivent nous présenterons les teneurs mesurées par famille de composés en fonction de l'origine de la matrice aqueuse.

4.1. Résultats des effluents de STEP

Les effluents comportent une grande variété de composés, dont une majorité est représentée par les perturbateurs endocriniens industriels (APs, APsEO et phtalates) et une minorité par des pesticides sous forme d'ultra-traces. La figure 2-25 présente les composés qui ont été quantifiés dans les effluents et l'eau potable. Aucun composé n'a été quantifié dans l'eau industrielle.

Ensuite nous avons classé ces échantillons selon leur classe environnementale d'après les valeurs seuils en pesticides de la DCE.

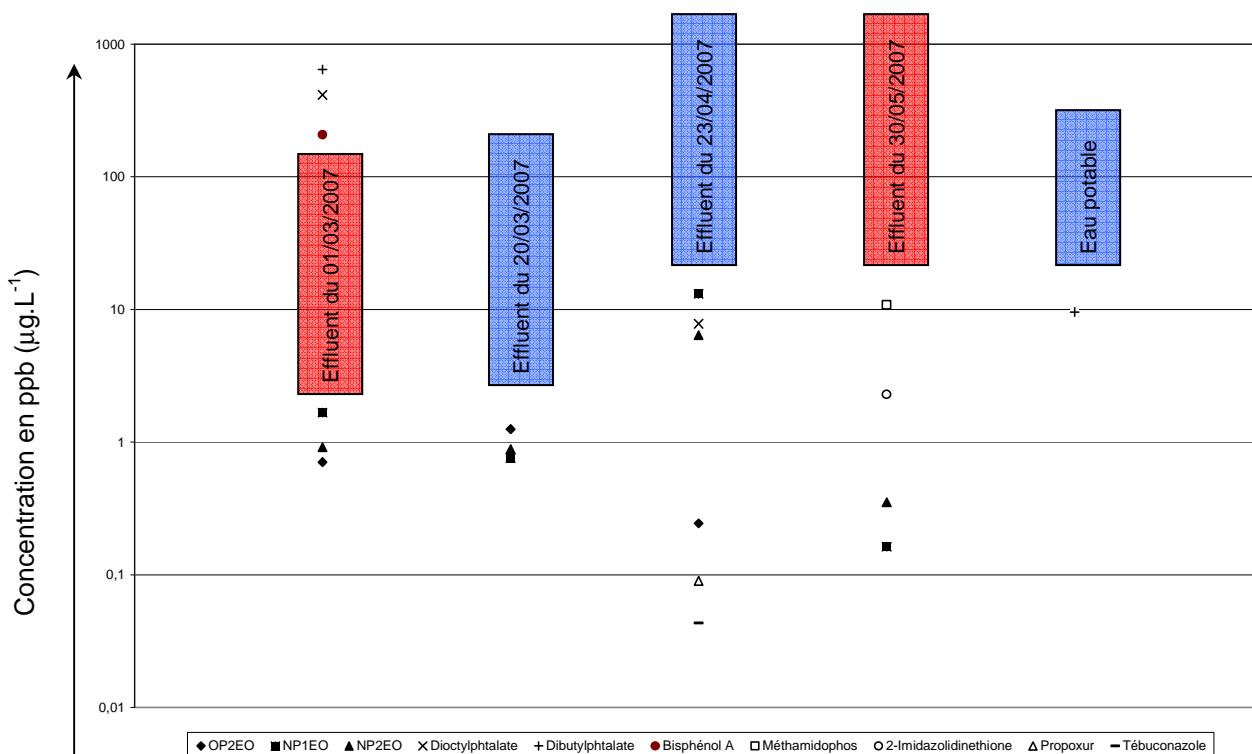


Figure 2-25 : Résultats obtenus pour les effluents et l'eau potable sur les composés quantifiés dans ces matrices en ppb ou $\mu\text{g.L}^{-1}$

- Les APs linéaires sont détectés mais leur concentration ne dépasse pas la limite de quantification. Les OPnEOs et NPnEOs sont quant à eux quantifiés et des teneurs de 0,25 à 13,20 ppb sont retrouvées.

- Les phtalates et le bisphénol A sont tous les trois présents dans tous les échantillons moyens analysés. Nous avons relevé de fortes concentrations pour l'effluent du 01/03/2007, teneurs comprises entre 208 et 645 ppb. On peut expliquer cela par le traitement ponctuel de la STEP de Saint Fons d'une quantité d'effluents industriels des sites voisins.

A noter que pour ces composés, nous avons soustrait un blanc de méthode, échantillon d'eau UP qui a subi le même protocole que les échantillons pour obtenir la concentration réelle.

- Les pesticides organophosphorés sont détectés et quantifiés régulièrement. La concentration du méthamidophos a été mesurée à 10,9 ppb dans l'effluent du 30/05/2007 et le diméthoate est détecté dans tous les échantillons sauf dans celui du 23/04/2007.

- Les carbamates sont des insecticides employés contre les pucerons, acariens, mouches présents sur les cultures de légumes et de fleurs, nous les avons tous détectés dans les effluents à partir de l'échantillon du 30/05/2007. Le méthamidophos et le 2-imidazolidinethione ont été quantifiés dans ce même échantillon à 10,9 et 2,3 ppb respectivement. Auparavant, seul le diméthoate a été détecté au mois de mars 2007. Il s'agit d'une substance active utilisée depuis plus de 40 ans et qui est très largement employée à partir du printemps lors des premières attaques d'insectes, pucerons, acariens et mouches sur les jeunes pousses.

- En ce qui concerne les pesticides organochlorés, peu sont détectés et seul le o,p-DDE a été détecté à 9,6 ppb dans l'effluent du 01/03/2007. Le HPTE, résidu de dégradation environnementale du méthoxychlore est présent dans 2 effluents, ceux du 01/03 et du 09/07.

- Les fongicides ont pu être déterminés pour tous les effluents, le prosulfocarbe est celui qui est détecté dans tous les échantillons et quantifié à 43 ppt dans l'effluent du 23/04/2007. Trois autres fongicides, hexaconazole, pyridabène et diméthomorphe sont présents de manière temporaire dans les effluents mais jamais détectés au-dessus des limites de quantification.

Dans l'ensemble de ces 5 échantillons analysés, l'effluent du 01/03/2007 semble être celui le plus pollué par nos composés. Les autres échantillons sont particulièrement touchés par la présence de perturbateurs endocriniens industriels et domestiques (APs, APnEOs, phthalates et bishénol A).

4.2. Résultats des eaux du robinet et industrielles

Nous avons choisi d'étudier deux autres types d'eaux disponibles au robinet du laboratoire, eau dite industrielle et eau potable. Les mêmes composés sont présents dans les deux échantillons (APnEOs, phthalates et bisphénol A, tébuconazole). Ce fongicide est le composé le plus persistant de cette famille avec une rémanence de plus de 8 semaines sur les cultures [53]. Néanmoins, on peut s'étonner en constatant que les composés retrouvés dans l'eau potable sont plus nombreux que dans l'eau industrielle non potable, même si les critères de potabilité, notamment bactériologiques, n'ont pas été relevés. Enfin, aucun des composés n'a pu être quantifiés, excepté le dibutylphthalate qui est détecté à une teneur de 9,6 ppb dans l'eau potable.

4.3. Résultats des eaux souterraines

Les eaux souterraines proviennent de l'infiltration des eaux de pluie dans le sol. Les microfissures et les failles dans les roches et les sols permettent à l'eau d'humidifier des couches de plus en plus profondes jusqu'à atteindre une poche constituée d'une couche imperméable créant ainsi une nappe phréatique.

La figure 2-26 présente les composés qui ont été quantifiés dans les eaux souterraines, les eaux de surface, eau de pluie et eaux traitées.

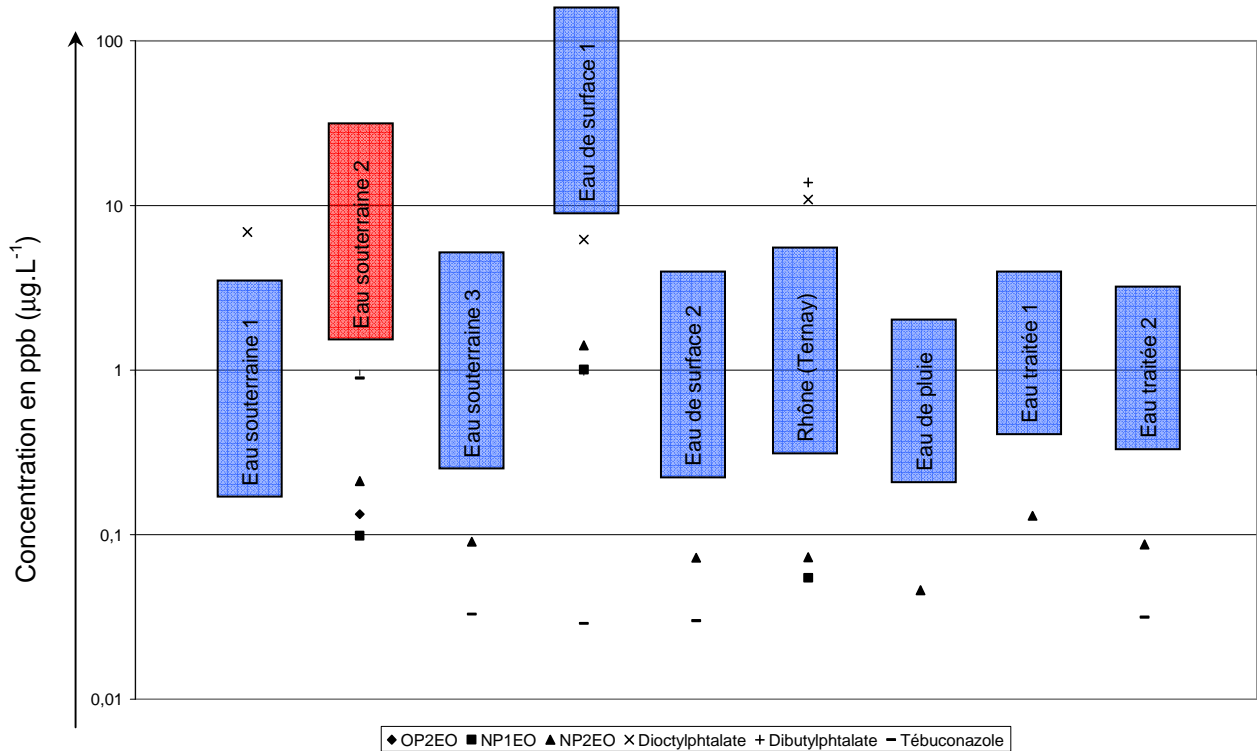


Figure 2-26 : Résultats obtenus pour les eaux souterraines, de surface, eau de pluie et eau traitée sur les composés quantifiés dans ces matrices en ppb ou $\mu\text{g.L}^{-1}$

- Nous avons analysé 3 échantillons qui ont tous présentés des concentrations d'APnEOs, de phtalates ainsi que du bisphénol A. Les teneurs varient de 33 ppt à 7 ppb.
- Notons que les carbamates et les pesticides organophosphorés sont absents des eaux souterraines analysées.
- Par contre les pesticides organochlorés sont détectés dans tous les échantillons. Le plus inquiétant est de retrouver des pesticides organochlorés dits de première génération interdits depuis les années 70 tels que les DDT et les métabolites associés.
- Enfin, le tébuconazole est quantifié entre 33 ppt et 0,89 ppb dans deux échantillons.

4.4. Résultats des eaux de surface et eau de pluie

Les eaux de surfaces sont représentées par les eaux courantes (cours d'eau, canal, fleuve, rivière ...) et par les eaux stagnantes (lac, retenue de barrage, étangs).

Nous avons analysé deux eaux de surface et deux eaux traitées qui ont été prélevées dans le cadre du programme de la DRASS, un échantillon d'eau du Rhône prélevé le 03 juin 2008 à hauteur de Ternay (20 km au sud de Lyon) et une eau de pluie prélevée sur le toit du laboratoire.

- De manière globale, toutes les eaux de cette série contiennent des perturbateurs endocriniens industriels et domestiques. Le NP₂EO est le seul composé quantifié dans tous les échantillons entre 0,046 et 1,41 ppb. L'eau du Rhône est celle dans laquelle nous avons pu quantifier le plus de composés (55 ppt de NP₁EO, 73 ppt de NP₂EO, 11 ppb de dioctylphthalate et 14 ppb de dibutylphthalate). L'eau de pluie est l'eau qui contient le moins de substances recherchées. Nous

pouvons noter l'absence du dibutylphtalate, du bisphénol A et du OP₃EO. Notons l'absence d'alkylphénols dans tous les échantillons analysés.

- Les eaux de surface et les eaux traitées ne contenaient pas de pesticides organophosphorés et de carbamates. Par contre, le Rhône et l'eau de pluie ont présenté des traces de diméthoate et de propoxur (prosulfocarbe en sus pour l'échantillon du Rhône).

- Pour les pesticides organochlorés, nous les avons détecté dans les eaux de la DRASS mais en aucune manière dans les eaux du Rhône, ni l'eau de pluie.

- Enfin le tébuconazole est détecté dans tous les échantillons avec des quantifications comprises entre 29 et 32 ppt. Les autres composés de cette famille sont uniquement détectés dans les eaux du Rhône et l'eau de pluie. Leur présence dans l'eau du fleuve peut être liée au lessivage des berges et en amont des sols cultivés puisque le prélèvement a été effectué après une période pluvieuse. Cependant, la présence de fongicides dans l'eau de pluie peut paraître surprenante. Le prélèvement de cet échantillon s'est fait suite à une journée de pluie (02/06/2008) et il a été collecté dans la formation d'une flaque d'eau sur le revêtement bitumeux du toit. Il s'est avéré que les revêtements de ce type sont la plupart du temps traités avec des fongicides. La composition est bien souvent un mélange de plusieurs substances actives afin d'élargir le spectre d'action et qui reste confidentiel et propre à chaque fournisseur. Enfin, une dernière hypothèse est à envisager, il pourrait s'agir d'un effet d'accumulation issue de plusieurs retombées atmosphériques et pluvieuses apportant de manière irrégulière des polluants sur la toiture.

5. Essais sur la réduction des limites

Pour abaisser les limites validées sur les effluents de STEP, nous avons débuté des essais sur un volume d'échantillon plus important extrait par SPE. Un volume de 500 mL d'eau UP dopée à environ 500 ng.L⁻¹ a été réalisé et des taux de récupération calculés. Le facteur de concentration est alors de 2500 au lieu de 1500 (300 mL dans 200 µL).

Alkyphénols	
Composés	Taux de récupération
tert-OP	75 %
4n-OP	99 %
OP ₁ EO	100 %
OP ₂ EO	73 %
OP ₃ EO	89 %
NP	73 %
4n-NP	62 %
NP ₁ EO	73 %
NP ₂ EO	110 %
NP ₃ EO	106 %

Organochlorés	
Composés	Taux de récupération
Méthoxychlore	83 %
HPTE	103 %
o,p DDE	54 %
p,p DDE	89 %
o,p DDD	53 %
p,p DDD	63 %
o,p DDT	43 %
p,p DDT	38 %

Organophosphorés et carbamates	
Composés	Taux de récupération
Diméthoate	44 %
Méthamidophos	6 %
2-imidazolidinethione	31 %
Propoxur	78 %
Prosulfocarbe	97 %

Fongicides	
Composés	Taux de récupération
Diméthomorphe	85 %
Bromuconazole	83 %
Fluquinconazole	83 %
Tétraconazole	76 %
Tébuconazole	74 %
Hexaconazole	69 %
Pyridabène	107 %

Phtalate et plastifiant	
Composés	Taux de récupération
Dibutylphtalate	100 %
Diéthylhexylphtalate	20 %
Bisphénol A	40 %

Tableau 2-17 : Taux de récupération évalués pour un volume de 500 mL d'eau UP dopée à 500 ng.L⁻¹

Les taux de récupération calculés sont satisfaisants pour les alkyphénols, les carbamates et les fongicides, compris entre 62 et 110 %. Par contre quelques composés ne sont pas correctement extraits grâce au même protocole mis au point pour les effluents, comme les organochlorés, les phtalates et le plastifiant, avec des taux de récupération de 20 à 38 % pour les plus faibles (p,p DDT et diéthylhexylphtalate). Cette évaluation nous permet d'obtenir une concentration beaucoup plus élevée et d'atteindre des limites de détection plus basses que celles validées pour les effluents de STEP. Ce protocole de préconcentration est valable pour des matrices moins chargées que les effluents de STEP telles que des eaux souterraines ou eaux potables en accord avec l'étude menée au paragraphe 4.1.2.1. Nous présentons dans le tableau 2-18, les résultats pour les substances qui donnent les meilleurs taux de récupération par famille.

Composés	LD instrumentale en ppb	LQ instrumentale en ppb	LD méthode en ppt	LQ méthode en ppt
Alkylphénols, phtalates et plastifiant				
tert-OP	1900 ± 100	6300 ± 320	760 ± 40	2500 ± 125
4n-OP	210 ± 10	685 ± 35	82 ± 4	270 ± 14
NPs	1851 ± 9	6170 ± 310	740 ± 40	2500 ± 125
4n-NP	205 ± 10	682 ± 34	82 ± 4	270 ± 14
OP ₁ EO	49 ± 2	164 ± 8	20 ± 1	66 ± 3
OP ₂ EO	15,5 ± 0,8	52 ± 3	6,2 ± 0,3	21 ± 1
NP ₁ EO	22 ± 1	75 ± 4	8,9 ± 0,5	30 ± 2
NP ₂ EO	21 ± 1	69 ± 3	8,2 ± 0,4	28 ± 1
Carbamates				
Propoxur	37 ± 2	121 ± 6	14,6 ± 0,7	49 ± 2
Prosulfocarbe	59 ± 3	95 ± 5	23 ± 1	38 ± 2
Triazoles et morpholine				
Tébuconazole	12,3 ± 0,6	41 ± 2	49 ± 0,2	16,4 ± 0,8
Hexaconazole	27 ± 1	90 ± 5	10,8 ± 0,5	36 ± 2
Tétraconazole	28 ± 1	94 ± 5	11,4 ± 0,6	38 ± 2
Fluquiconazole	17,6 ± 0,9	59 ± 3	7,0 ± 0,4	23 ± 1
Bromuconazole	9,7 ± 0,5	32 ± 2	39 ± 2	129 ± 0,6
Diméthomorphe	14,7 ± 0,7	49 ± 2	5,9 ± 0,3	20 ± 1
Pyridabène	14,7 ± 0,7	49 ± 2	5,9 ± 0,3	20 ± 1

Tableau 2-18 : Limites de détection et de quantification pour un protocole de concentration de 2500 fois

Cette étape d'optimisation de la SPE sur eau UP, nous permet maintenant d'atteindre des limites de détection et de quantification beaucoup plus faibles. Elles sont calculées avec un facteur de concentration de 2500 soit 1,67 fois celui déterminé sur les effluents. La plus haute limite de détection se situe à 0,76 ppb et la plus faible à moins de 4 ppt.

Conclusion – Objectifs atteints

La mise au point d'une méthode d'analyse multi-familles d'ultra-traces et traces dans des matrices environnementales aqueuses nécessite une optimisation complète de nombreux paramètres.

Les techniques analytiques employées sont basées sur des systèmes chromatographiques couplés à la spectrométrie de masse et ont été étudiés. Après obtention de la meilleure séparation, la détection a été optimisée et la meilleure sensibilité possible a été recherchée par :

- choix du meilleur solvant d'injection en CPG-SM,
- décision de la technique la plus sensible pour chacun des composés,
- sélection de la meilleure phase stationnaire et de la composition de la phase mobile en CPL-SM.

Par la suite, la préparation d'échantillon a nécessité une phase de concentration, réalisée ici par SPE.

Cette étape nous a permis de fixer :

- les pourcentages d'analytes recueillis dans l'extrait par mesures des taux de récupération évalués
- le facteur de concentration par le volume d'échantillon chargé et le volume d'injection,
- les limites de détection qu'il sera possible d'atteindre.

Un maximum des variables liées à la SPE ont été optimisés : phase solide utilisée, pH de l'échantillon, vitesse et volume de chargement et solvants d'élution spécifiques aux analytes recherchés.

Ceci nous a permis d'aboutir à des limites de détection basses pour une matrice chargée telle que les effluents de STEP, ces limites étant en rapport avec la réglementation ($C_{\text{pesticides}} < 0,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Les limites de détection sur cette même matrice ont été en partie validées. Ces limites pour les effluents de STEP sont comprises entre 6 ppt pour le tébuconazole et 3,1 ppb pour le bisphénol A.

Enfin, nous avons débuté une procédure de validation de la méthode d'extraction SPE pour des matrices moins chargées en fraction organique dissoute avec un volume de charge de 500 mL en SPE dans le but d'augmenter le facteur de concentration et donc de diminuer les limites de détection et de quantification (figure 2-27). Une partie de la validation de la méthode est en cours d'étude en particulier pour l'analyse par CPG.

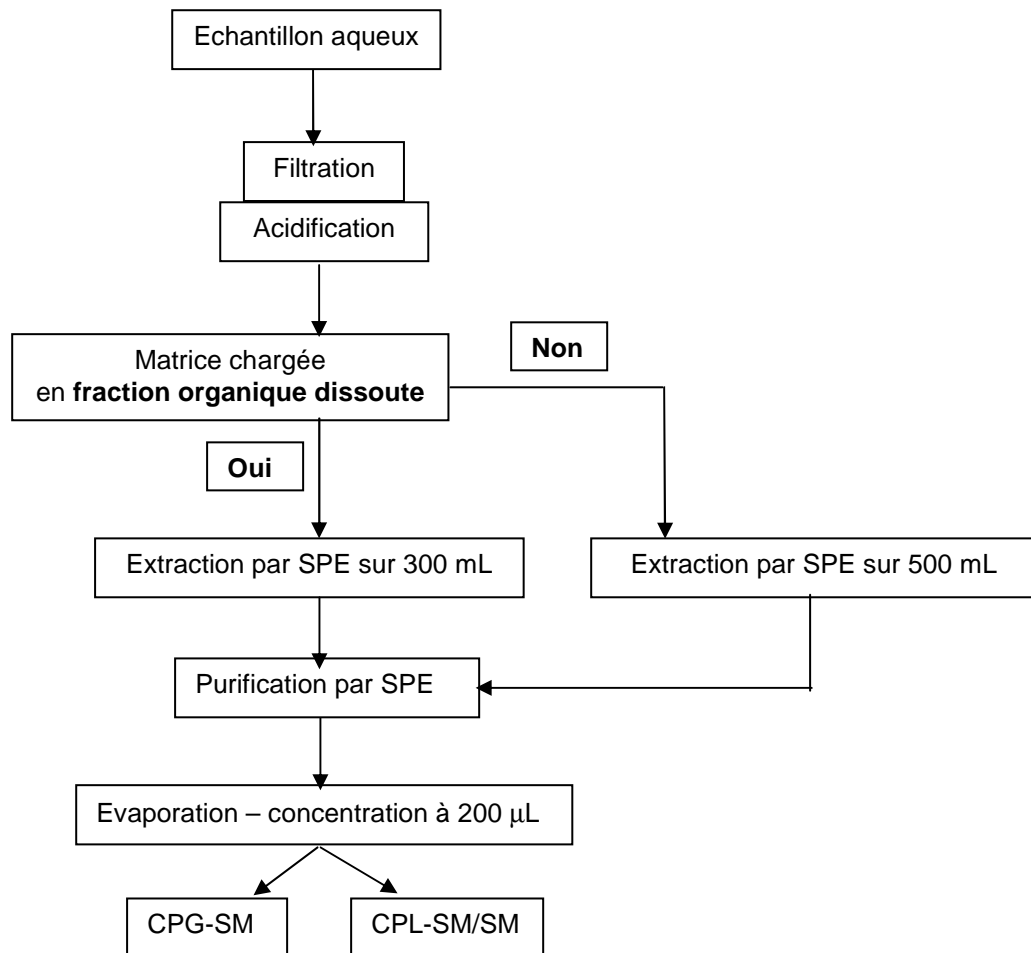


Figure 2-27 : Schéma synoptique du protocole analytique mis en place pour les matrices aqueuses

Références bibliographiques du chapitre II

1. Bester, K. (2008). Quantification with HPLC-MS/MS for environmental issues: quality assurance and quality assessment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 15-20
2. Baugros, J.-B., Giroud, B., Dessalces, G., Grenier-Loustalot, M.-F. & Cren-Olivé, C. (2008). Multiresidue analytical methods for the ultra-trace quantification of 33 priority substances present in the list of REACH in real water samples. *Analytica Chimica Acta*, 607, 191-203
3. Datta, S., Loyo-Rosales, J. E. & Rice, C. P. (2002). A Simple Method for the Determination of Trace Levels of Alkylphenolic Compounds in Fish Tissue Using Pressurized Fluid Extraction, Solid Phase Cleanup, and High-Performance Liquid Chromatography Fluorescence Detection *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 1350-1354
4. Parlement Européen/Council directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. 3 novembre 1998, Rule number
5. Parlement Européen/Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council establishing a framework for the Community action in the field of water policy. 23 octobre 2000, Rule number 2000/60/EC
6. Basheer, C., Lee Kee, H. & Obbard, P. (2002). Determination of organochlorine pesticides in seawater using liquid-phase hollow fibre membrane microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 968, 191-199
7. Gatidou, G., Thomaidis, N., Stasinakis, A. & Lekkas, T. (2007). Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1138, 32-41
8. Gonçalves, C. & Alpendurada, M. F. (2002). Multiresidue method for the simultaneous determination of four groups of pesticides in ground and drinking waters, using solid-phase microextraction-gas chromatography with electron-capture and thermionic specific detection. *Journal of Chromatography A*, 968, 177-190
9. Lee, H.-B., Peart, T. & Svoboda, L. (2005). Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1094, 122-129
10. Lyytikäinen, M., Kukkonen, J. & Lydy, M. (2003). Analysis of pesticides in water and sediment under different storage conditions using gas chromatography. *Archive of Environmental Contamination Toxicology*, 44, 437-444
11. Ochiai, N., Sasamoto, K., Kanda, H. & Nakamura, S. (2006). Fast screening of pesticides multiresidue in aqueous samples by dual stir bar sorptive extraction-thermal desorption-low thermal gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1130, 83-90
12. Santos Delgado, M. J., Rubio Barroso, S., Toledano fernandez-Tostado, G. & Polo-Diez, L. M. (2001). Stability studies of carbamate pesticides and analysis by gas chromatography with flame ionization and nitrogen-phosphorus detection. *Journal of Chromatography A*, 921,
13. Serôdio, P. & Nogueira, J. (2004). Multi-residue screening of endocrine disrupters chemicals in water samples by stir bar sorptive extraction-liquid desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta*, 517, 21-32

14. Raffin, G. (2006). *Validation de méthodes d'analyses (comparaison d'une méthode alternative avec une méthode de référence)* SCA-CNRS.
15. Parlement Européen. (12 août 2002). Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.
16. Conseil de la Communauté Européenne/Journal Officiel L330. Directive 98/83/EEC du Conseil du 03 novembre 1998 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine. 1998, Rule number 98/83/EEC
17. Conseil de la Communauté Européenne/Journal Officiel L 221. Commission decision 2002/657/EEC of 12 August 2002 complément à la directive 96/23/EEC au sujet des performances des méthodes analytiques et à l'interprétation des résultats. 12 Août 2002, Rule number 2002/657/EEC
18. British Crop Protection Council (2003). *The Pesticide Manual* (Thirteenth Edition). Alton, BCPC.
19. Carabias-Martinez, R., Garcia-Hermida, U., Rodriguez-Gonzalo, E.& Ruano-Miguel, L. (2005). Behaviour of carbamate pesticides in gas chromatography and their determination with solid-phase extraction and solid-phase microextraction as preconcentration steps *Journal of Separation Science*, 28, 2130-2138
20. Ferguson Lee, P., Iden, C., Brownawell, B., Knepper, T.& Barcelo, D. (2001). Analysis of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in environmental samples by mixed-mode high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 938, 79-91
21. Ferguson Lee, P., Iden, C.& Bronwnawell, B. (2000). Analysis of alkylphenol ethoxylate metabolites in their aquatic environment using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry Washington DC*, 72, 4322-4330
22. Loyo-Rosales, J. E., Schmitz-Alfonso, I., Rice, C. P.& Torrents, A. (2003). Analysis of octyl- and nonylphenol and their ethoxylates in water and sediments by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 75, 4811-4817
23. Dolan, J. W. (2002). Temperature selectivity in reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 965, 195-205
24. Babay, P. A., Gettar, R. T., Magallanes, J. F., Becquart, E. T., Thiele, B.& Batistoni, D. A. (2007). Column temperature as an active variable in the isocratic, normal-phase high-performance liquid chromatography separation of lipophilic metabolites of nonylphenol ethoxylates. *Journal of Chromatography A*, 1157, 227-236
25. Marcel, C. (1991). *Chromatographies en phases liquide et supercritique* (3ième édition). Masson.
26. Wolcott, R. G., Dolan, J. W., Snyder, L. R., Bakalyar, S. R., Arnold, M. A.& Nichols, J. A. (2000). Control of column temperature in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 869, 211-230
27. Niessen, D. W. M. A. (2006). *Liquid Chromatography-mass Spectrometry: Mass Spectrometry* CRC Press.

28. El Atrache, L., Sabbaha, S. & Morizurb, J. P. (2004). Identification of phenyl-N-methylcarbamates and their transformation products in Tunisian surface water by solid-phase extraction liquid chromatography–tandem mass spectrometry *Talanta*, *65*, 603-612
29. Jahnke, A., Gandrass, J. & Ruck, W. (2004). Simultaneous determination of alkylphenol ethoxylates and their biotransformation products by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1035*, 115-122
30. Jeannot, R., Sabik, H., Sauvard, E. & Genin, E. (2000). Application of liquid chromatography with mass spectrometry combined with photodiode array detection and tandem mass spectrometry for monitoring pesticides in surface waters. *Journal of Chromatography A*, *879*, 51-71
31. Jonkers, N., Knepper, T. & De Voogt, P. (2001). Aerobic biodegradation studies of nonylphenol ethoxylates in river water using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Environmental Science technology*, *35*, 335-340
32. Kampioti, A., Borba da Cunha, A., Lopez de Alda, M. & Barcelo, D. (2005). Fully automated multianalyte determination of different classes of pesticides, at picogram per litre levels in water, by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *382*, 1815-1825
33. Nogueira, J., Sandra, T. & Sandra, P. (2004). Multiresidue screening of neutral pesticides in water samples by high performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, *505*, 209-215
34. Petrovic, M., Barcelo, D., Diaz, A. & Ventura, F. (2003). Low nanogram per liter determination of halogenated nonylphenols, nonylphenol carboxylates, and their non-halogenated precursors in water and sludge by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of American Society for Mass Spectrometry*, *14*, 516-527
35. Sannino, A., Bolzoni, L. & Bandini, M. (2004). Application of liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry to the determination of a new generation of pesticides in processed fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, *1036*, 161-169
36. Schermerhorn, P., Golden, P., Krynsky, A. & Leimkuehler, W. (2005). Determination of 22 triazole compounds including parent fungicides and metabolites in apples, peaches, flour, and water by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, *88*, 1491-1502
37. Stout, S. J., daCunha, A. R., Picard, G. L. & Safarpour, M. M. (1996). Rapid, direct determination of imidazolinone herbicides in water at the 1 ppb level by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *44*, 2182-2186
38. Constantopolous, T. L., Jackson, G. S. & Enke, C. G. (1999). Effects of salt concentration on analyte response using electrospray ionization mass spectrometry. *American Society for Mass Spectrometry*, *10*, 625-634
39. Keunchkarian, S., Reta, M., Romero, L. & Castells, C. (2006). Effect of sample solvent on the chromatographic peak shape of analytes eluted under reversed-phase liquid chromatographic conditions. *Journal of Chromatography A*, *1119*, 20-28

40. Layne, J., Farcas, T., Rustamov, I. & Ahmed, F. (2001). Volume-load capacity in fast-gradient liquid chromatography Effect of sample solvent composition and injection volume on chromatographic performance. *Journal of Chromatography A*, 913, 233-242
41. Vuillet, E., Baugros, J.-B., Flament-Waton, M.-M. & Grenier-Loustalot, M.-F. (2007). Analytical methods for the determination of selected steroid sex hormones and corticosteroids in wastewater. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 2143-2151
42. Thiele, B., Günther, K. & Schwuger, M. J. (1997). Alkylphenols ethoxylates : trace analysis and environmental behavior. *Chemistry Review*, 97, 3247-3272
43. Ahel, M., Schaffner, C. & Giger, W. (1996). Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment - III. Occurrence and elimination of their persistent metabolites during infiltration of river water to groundwater. *Water Research*, 30, 37-46
44. Shukla, G., Kumar, A., Bhanti, M., Joseph, P. E., Taneja, A. & Sarkar, A. (2006). Organochlorine pesticides contamination of ground water in the city of Hyderabad. *Environmental International*, 32, 244-247
45. Fernandez, M., Garcia, C., Garcia-Villanova, R. & Gomez, J. (1996). Evaluation of liquid-solid extraction with new sorbent and liquid-liquid extraction for multiresidue pesticides. Determination in raw and finished drinking waters. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 1790-1795
46. Céspedes, R., Lacorte, S., Ginebreda, A. & Barcelo, D. (2006). Chemical monitoring and occurrence of alkylphenols, alkylphenol ethoxylates, alcohol ethoxylates, phthalates and benzothiazoles in sewage treatment plants and receiving waters along the Ter river basin (Catalonia, N.E. Spain). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385, 992-1000
47. University of California, D., Oregon State University, Michigan State University, Cornell University, University of Idaho, . EXTOWNET - EXTension TOXicology NETwork. 2005. Disponible à partir de <http://extownet.orst.edu/>
48. University of Hertfordshire. Environmental Management for Agriculture. 2006. Disponible à partir de www.herts.ac.uk
49. Hernando, M. D., Heath, E., Petrovic, M. & Barcelo, D. (2004). Trace-level determination of pharmaceutical residues by LC-MS/MS in natural and treated waters; A pilot-survey study. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385, 985-991
50. Hajslova, J., Holadova, K., Poustka, J., Godula, M., Cuhra, P. & Kempny, M. (1998). Matrix-induced effects : a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticides residues. *Journal of Chromatography A*, 800, 283-295
51. Krueve, A., Künnapas, A., Herodes, K. & Leito, I. (2008). Matrix effect in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1187, 58-66
52. Stüber, M. & Reemtsma, T. (2004). Evaluation of three calibration methods to compensate matrix effects in environmental analysis with LC-ESI-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 910-916
53. Association de Coordination Technique Agricole (Ed.) (2006) Index Phytosanitaire, ACTA, ACTA.

Chapitre III

III.1 Réglementation et caractérisation des matrices solides

1. Introduction

La qualité des eaux et plus généralement celle des milieux aquatiques est devenue une préoccupation majeure des populations. Or, l'eau durant son parcours rentre en contact avec des sols, des sédiments ou d'autres matrices solides de l'environnement. Elles se chargent, quant à elles, en matière en suspension conduisant peu à peu à leur contamination. En conséquence, Il est nécessaire de s'intéresser également à ces différents compartiments environnementaux.

Nous avons donc mis en place une méthode d'analyse de 33 composés sélectionnés dans le chapitre II afin de les extraire, les analyser et les quantifier dans les sols, les matières en suspension et les boues de STEP.

Dans une première partie nous exposerons les problèmes rencontrés et surmontés pour effectuer une préparation d'échantillon rigoureuse afin de parvenir à une analyse reproductible, fiable et sensible. Puis nous présenterons l'optimisation de l'extraction simultanée des composés obtenue à partir de l'évaluation des paramètres de l'extraction par plan d'expériences. La dernière partie nous permettra de présenter les derniers résultats obtenus sur les différentes matrices testées.

2. Les matrices solides – Aspects réglementaires

Les matrices solides environnementales sont représentées essentiellement par les sols, les sédiments (rivière, mer, lac), les retombées atmosphériques et les boues de STEP. Ces dernières ont fait l'objet d'attentions particulières car la quantité croissante de leur production pousse les centres d'assainissement des eaux usées à les incinérer ou à les réutiliser. En ce qui concerne leur transformation, plusieurs solutions existent : leur épandage sur les terrains agricoles représente la technique la plus courante (~65%, ADEME) après la mise en décharge (~20%, ADEME), l'incinération (~15%, ADEME) ou la valorisation par des nouveaux procédés (méthanisation comme à Marseille, destruction de la matière organique par oxydation par voie humide comme à Bruxelles). On comprend alors aisément que la composition des boues doit être connue.

La réglementation européenne sur l'épandage des boues dans le but d'une valorisation agronomique s'articule autour d'une directive européenne 86/278 en date du 12 juin 1986 et vise à autoriser leur épandage que lorsque leur utilisation ne nuit pas à la qualité des sols en apportant des éléments toxiques (métaux lourds) ou polluants organiques (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques, HAPs). Cette directive impose des valeurs limites de concentration en métaux lourds dans les sols, dans les boues et plus précisément les quantités annuelles de métaux lourds pouvant être introduites dans les sols. Depuis 2002, en France, suite à la transcription en droit national de la directive européenne 1999/31, " la mise en décharge de déchets est autorisée uniquement pour des éléments ou matières qui ne sont pas susceptibles d'être traités dans des conditions techniques et économiques du moment, notamment par extraction de la part valorisable ou par réduction de leur caractère polluant ou dangereux ".

Le projet de directive-cadre sur la protection des sols est un projet de directive européenne du Parlement européen et du Conseil proposé par la commission le 22 septembre 2006 (COM(2006) 232 final) et adopté en première lecture le 14 novembre 2007 par les députés européens. Il vise à mettre en

œuvre une stratégie en faveur de la protection des sols et lutter contre leur dégradation à l'échelle européenne. Déjà plus communément dénommée « *Directive sols* », ce texte définit un premier cadre européen pour la protection des sols.

Le règlement REACH vient quant à lui contrôler le devenir des substances chimiques dans l'environnement et tout naturellement aussi celles qui contaminent les matrices solides.

2.1. Boues de STEP

On distingue différents types de boues selon les traitements appliqués en STEP :

- Les boues primaires issues des dépôts collectés par une simple décantation des eaux usées (dans les décanteurs par exemple. Elles présentent des concentrations élevées en matières minérales (sables, terre...),
- Les boues physico-chimiques qui ressemblent aux boues primaires sont obtenues par ajouts de réactifs (sels de fer, d'aluminium, et autres agents flocculant) durant le traitement de l'eau usée pour agglomérer les fines particules et améliorer la décantation,
- Les boues biologiques, appelées boues secondaires, proviennent d'une épuration biologique des eaux (boues activées, disques biologiques, lits bactériens...). Ces boues sont très organiques.

2.1.1. Origine des boues

Les boues sur lesquelles nous avons travaillées proviennent de la STEP de Saint Fons (Rhône), elles sont issues du recyclage des boues activées, on les appelle « boues en excès ». L'épuration par boues activées consiste à mettre en contact par brassage les eaux usées avec un mélange riche en bactéries pour dégrader la matière organique en suspension ou dissoute. Les boues secondaires dans le système de traitement de la STEP de Saint Fons, contiennent une forte proportion de matières organiques et ont une siccité comprise entre 15 et 30 %. La siccité représente le pourcentage massique de matière sèche.

2.1.2. Composition des boues

La composition exacte des boues varie en fonction de l'origine des eaux usées, de la période de l'année et du type de traitement et de conditionnement pratiqué dans la station d'épuration. La matière organique des boues est constituée de matières particulaires éliminées par gravité durant le traitement primaire, des lipides (6 à 19 % de la matière organique), des polysaccharides, des protéines et des acides aminés (jusqu'à 33 % de la matière organique), de la lignine, ainsi que des produits de métabolisation et des corps microbiens résultant des traitements biologiques. Tout ceci constitue environ 40 à 80 % de matière sèche de boues. De plus, tous les éléments d'origine anthropiques assez fins pour passer les grilles du prétraitement peuvent se retrouver dans les boues [1].

2.2. Sols – Matières en suspension - Sédiments

Les autres types de matrices solides peuvent être des sols agricoles ou des sols pollués par des activités humaines ou industrielles. Ils constituent la couche superficielle de la croûte terrestre. La recherche des polluants permet alors de mesurer leur risque sanitaire.

L'analyse des composés sélectionnés peut être également réalisée sur des sédiments de rivières, lacs ou marins. Les sédiments sont issus du dépôt de particules solides transportées par le mouvement d'un fluide, dans le cas des sédiments il s'agit de l'eau qu'elle soit de pluie, de surface ou souterraine.

Finalement, les polluants s'absorbent au sein des solides entraînant une biodisponibilité plus ou moins forte vis-à-vis des écosystèmes.

2.3. Retombées atmosphériques

L'air est également un vecteur de transport de matières solides qui, une fois déposées, sont alors appelées « retombées atmosphériques ». La plupart du temps, elles sont issues de particules solides d'origine anthropique (suies industrielles ou poussières d'usines d'incinération) et parfois d'origine naturelle (pollen, sable véhiculé par les vents ou plus rarement suies de volcan). En outre, la pluie lessivant l'atmosphère aide à ramener de nombreux polluants au sol. Ainsi de nombreuses molécules peuvent être transportées par l'air et beaucoup d'études commencent à être menées plus particulièrement sur la pollution de l'air par les pesticides et d'autres molécules persistantes [2-5].

3. Caractéristiques des échantillons obtenus

Les boues sur lesquelles nous avons optimisé le protocole de préparation, d'extraction et de purification de l'échantillon proviennent d'une des principales STEP du Grand Lyon, celle de Saint Fons. Nous avons étudié plus précisément cet échantillon en réalisant des analyses élémentaires et moléculaires.

3.1. Caractéristiques physico-chimiques

Ces boues sont des boues secondaires issues du fonctionnement de la STEP. On peut les caractériser principalement par leur siccité, ~20% de Matière Sèche (MS), elles présentent donc une humidité de ~80% et leur pH élevé (pH \approx 8) du fait de leur désactivation bactérienne par ajout de chaux. D'autres paramètres telle que la Matière Volatile Sèche (MVS) est utile à l'évaluation des performances de la STEP, elle est de l'ordre de 60%. La Matière Organique (MO) a été aussi mesurée de l'ordre de 60% de MS. La teneur en azote total est mesurée au Kjeldahl, la concentration est de 8 kg/tonne de matière fraîche. Enfin, si les boues sont vouées à être épandues, il est obligatoire de mesurer certains métaux lourds ainsi que des PolyChloroBiphényles (PCB) selon l'arrêté ministériel de la République Française du 8 janvier 1998.

3.2. Analyse élémentaire

Nous avons poursuivi la caractérisation de l'échantillon de boue par des analyses élémentaires avec la détermination du carbone organique total et du carbone inorganique ainsi qu'une recherche des métaux par plasma couplé induit (Inductively Coupled Plasma) avec détection par Spectrométrie de Masse

(PCI-SM). Ces métaux sont listés à la fois par l'arrêté du 8 janvier 1998 et par la Directive Cadre Eau Européenne (DCE).

3.2.1. Microanalyse élémentaire

L'analyse du carbone organique/inorganique, de l'hydrogène, de l'azote, de l'oxygène et du soufre permet de déterminer le taux de matière organique sur la boue de STEP. Les microanalyses élémentaires sont réalisées sur des appareillages conçus au laboratoire, sauf pour le dosage du soufre réalisé sur un LECO (modèle SC114). La combustion à plus de 1050°C de l'échantillon sous un flux gazeux conduit à la formation de gaz spécifique de chaque élément recherché.

Le carbone et l'hydrogène sont analysés après combustion à 1050°C sous flux d'oxygène entraînant la formation respective de dioxyde de carbone et d'eau détectés spécifiquement par spectroscopie infrarouge.

L'azote est transformé à 1050°C sous un flux d'hélium et d'oxygène en divers oxydes d'azote qui sont réduits en azote moléculaire avant d'être quantifié par catharométrie (conductimétrie thermique).

L'oxygène des composés de pyrolyse obtenus à 1080°C sous courant d'azote est transformé en monoxyde de carbone par passage sur du charbon actif à 1120°C. La détection est faite par spectroscopie infrarouge.

Le soufre est transformé en dioxyde de soufre obtenu sous courant d'oxygène après combustion de l'échantillon à 1350°C, il est quantifié par spectroscopie infrarouge.

Les résultats sont présentés dans le tableau 3-1.

Matrice/Élément	C (%)	H (%)	N (%)	O (%)	S (%)	Total (%)
Boue de STEP	45,34	6,64	5,63	26,04	1,05	84,70
Matières en suspension du Rhône	5,32	0,56	0,18	-	-	6,06
Dépôt toiture	10,24	0,83	0,30	-	-	11,37
Retombées atmosphériques	10,87	1,11	0,28	-	-	12,26

Tableau 3-1 : Résultats de la microanalyse élémentaire des échantillons obtenus

La teneur en oxygène des échantillons de matière en suspension, de dépôts de toiture et de retombées atmosphériques n'a pas été déterminée car ces échantillons contiennent une grande proportion de matière inorganique (silicates) qui sera partiellement analysé. Ceci implique une analyse non répétable de cet élément et qui doit être considérée par défaut. De plus, étant donné le bilan $C+H+N+O+S \approx 85\%$, le résidu inorganique de la boue représente environ 15% ce qui fait de la mesure de l'oxygène, une teneur par défaut.

3.2.2 Analyse des métaux par PCI-SM

Nous avons réalisé les analyses élémentaires des boues étudiées avec une recherche multi-éléments. Les métaux étudiés sont le mercure, le cadmium, l'arsenic, l'étain, le nickel, le zinc et le plomb. Ces éléments sont listés à la fois par la DCE et l'arrêté du 8 juin 1998.

3.2.2.1. Protocole de minéralisation et d'analyse

Après plusieurs essais sur des quantités différentes d'échantillon de boue lyophilisée et tamisée, combinées à différents acides (acide fluorhydrique, acide perchlorique, acide chlorhydrique, acide nitrique, et acide sulfurique), la minéralisation a été conduite sur 25 mg de boue environ en présence d'un mélange acide nitrique/eau oxygénée, 10/5, v/v soumis à des micro-ondes à une puissance de 1000 W. Un programme de température permet d'accélérer le processus avec une rampe jusqu'à 220°C en 35 minutes puis un palier pendant 15 minutes.

Le volume de la minéralisation est dilué dans une fiole de 50 mL en présence d'or pour complexer le mercure et d'indium à 10 µg.L⁻¹ en tant qu'étalon interne. La solution est filtrée à 0,45 µm avant analyse par ICP-MS.

Les travaux ont été menés sur un PCI-SM de type PQ-Excel (SM quadripolaire). Les paramètres instrumentaux du plasma ont été optimisés sur le signal de l'yttrium, ⁸⁹Y, comme étalon interne, de façon à obtenir l'intensité la plus importante et la meilleure stabilité.

Deux méthodes de calibration ont été étudiées, l'étalonnage externe et les ajouts dosés afin de palier à un effet de matrice. La gamme d'étalonnage externe a été construite à partir d'une solution mère multi-éléments à 2500 µg.L⁻¹ avec des dilutions comprises entre 1 et 100 µg.L⁻¹. Pour la méthode des ajouts dosés la gamme d'étalonnage est comprise entre 0,5 et 50 µg.L⁻¹.

3.2.2.2. Résultats sur les boues de STEP et comparaison avec les valeurs limites réglementaires

Les résultats calculés sur une moyenne de trois prises d'essais pour les deux méthodes d'étalonnage sont regroupés dans le tableau 3-2. Les valeurs limites proposées par l'arrêté du 8 janvier 1998 sont également mentionnées pour comparaison. Toutes les valeurs sont rapportées à une masse d'un kilo de matière sèche.

Eléments	Etalonnage externe (mg.kg ⁻¹)	Etalonnage ajouts dosés (mg.kg ⁻¹)	Valeur limite dans les boues (mg.kg ⁻¹)
Cadmium (¹¹¹ Cd)	1,9	2,3	20
Mercure (²⁰² Hg)	1,8	1,7	10
Nickel (⁶⁰ Ni et ⁶² Ni)	74,0	91,3	200
Plomb (²⁰⁷ Pb et ²⁰⁸ Pb)	93,5	101	800
Zinc (⁶⁴ Zn, ⁶⁶ Zn et ⁶⁷ Zn)	ND	1876	3 000
Etain (¹²² Sn)	57,3	61,1	NA
Arsenic (⁷⁵ As)	3,6	3,4	NA

Tableau 3-2 : Concentrations d'éléments métalliques mesurées par PCI-SM sur un échantillon de boue lyophilisée (ND, Non Déterminé ; NA, Non Applicable)

Ces résultats montrent que les teneurs retrouvées dans les boues étudiées sont inférieures aux valeurs limites admises par la législation Française, quelque soit le métal recherché. De plus, on constate que les concentrations retrouvées par les deux méthodes d'étalonnage sont relativement proches, ce qui laisse supposer un très faible effet de matrice.

3.3. Analyse des composés volatils

Il est également intéressant de faire un screening des composés volatils à partir d'un échantillon de boue non lyophilisée. Cette expérience a été réalisée par chromatographie gazeuse à espace de tête (HeadSpace, HS). Une masse d'échantillon de 4 g environ est chauffée à 80°C pendant 35 minutes puis l'injecteur prélève la phase gazeuse contenant les composés volatils libérés par l'échantillon. Un volume d'injection de 1 ml permet d'obtenir le chromatogramme présenté sur la figure 3-1.

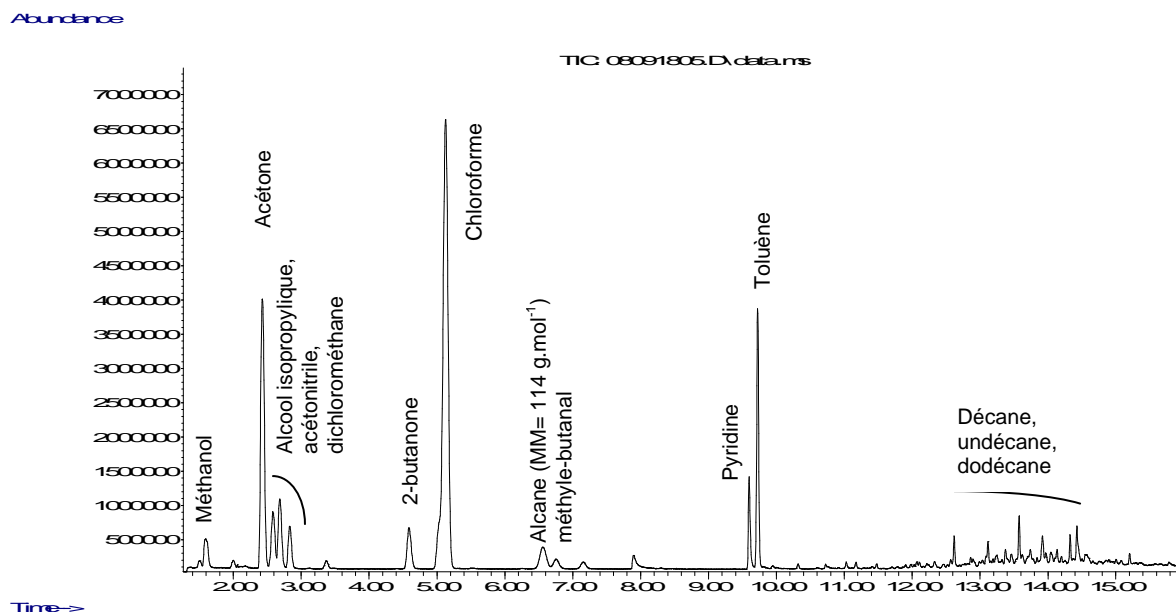


Figure 3-1 : Chromatogramme d'un échantillon de boue fraîche analysée par HS-CPG/SM

On note la présence de traces de quelques solvants comme l'acétone, le toluène et le chloroforme. L'alcool isopropylique, la pyridine, l'acétonitrile, le dichlorométhane, et la 2-butanone sont également détectés. Enfin, le chromatogramme fait apparaître sous forme d'ultra-traces des alcanes, du décane, de l'undécane, du dodécane et un alcane de masse molaire 114 g.mol⁻¹.

Aucune réglementation n'est mise en place pour ces molécules lorsqu'elles sont identifiées dans les boues, nous n'avons donc pas réalisé de quantification sur celles-ci.

4. Conclusion

Les matrices environnementales solides représentent un compartiment susceptible d'être contaminé lentement par l'eau ou l'air qui véhicule les contaminants. Dans cette situation, elles constituent des réservoirs de polluants prêts à être diffusés.

L'optimisation du protocole d'analyse qui est développé dans ce projet est basé, dans un premier temps, sur les boues de STEP, nous avons donc caractérisé de manière complète celle-ci par rapport à la réglementation existante sur les métaux, les éléments C,H,N,O et S ainsi que les composés organiques volatiles. Les autres échantillons analysés, telles que les matières en suspension, les retombées atmosphériques et les dépôts de toiture ont également été caractérisés.

III.2 Optimisation de l'extraction des substances à partir des matrices solides et étude de la purification de l'extrait obtenu

1. Introduction – Objectifs

L'hétérogénéité et la composition complexe des matrices solides ainsi que leur teneur en eau sont des paramètres dont on doit tenir compte pour l'extraction. Afin de parvenir à une analyse reproductible et fiable, nous devons mettre en œuvre une préparation d'échantillon rigoureuse. L'extraction simultanée de plusieurs molécules, ayant des caractéristiques et des propriétés physico-chimiques différentes, est une étape délicate qui nécessite une optimisation. De nombreux facteurs entrent en compte, c'est dans ce contexte qu'un plan d'expérience a été mis en place. Auparavant, la procédure de dopage des matrices solides a été évaluée et le choix des paramètres de l'extracteur ajusté aux composés sélectionnés. Enfin l'extrait obtenu requiert une purification, étape qui a été étudiée à l'aide de différentes méthodes.

2. Prétraitement de la matrice solide

A cause de sa composition complexe, un prétraitement de l'échantillon doit être mis en place avant extraction des analytes afin d'optimiser un protocole d'extraction multi-familles.

L'échantillonnage et le prétraitement sont des étapes extrêmement critiques qui ne doivent induire ni perte des analytes, ni modification des espèces, ni contamination de l'échantillon. Pour cela, il faut considérer plusieurs facteurs comme les conditions physiques de prélèvement (profondeur, quantité et topographie) et les conditions météorologiques précédant le prélèvement.

Les solides que nous avons à traiter contiennent une importante part d'eau (boue de STEP, matières en suspension de rivières, boue de toit), il est nécessaire de connaître la quantité précise de matière analysée sans comptabiliser le poids en eau. De plus, l'échantillon doit être homogène afin de permettre une excellente répétabilité de l'extraction, c'est pourquoi un échantillon sec et finement divisé est nécessaire. Enfin, l'échantillon doit être traité dans sa globalité afin d'obtenir une meilleure représentativité de la répartition des molécules recherchées.

2.1. Séchage

Le séchage de l'échantillon est une étape importante de l'analyse pour plusieurs raisons : d'une part à cause de l'humidité qui peut altérer la composition initiale notamment par la prolifération de microorganismes durant sa conservation avant analyse, d'autre part la variation de la quantité d'eau absorbée qui dépend des conditions atmosphériques, des conditions et des traitements en stations pour les boues de STEP. Ainsi, la quantité d'eau varie en modifiant la masse de l'échantillon affectant la répétabilité de la stratégie analytique.

Pour ne pas perdre les composés les plus volatils et pour éviter la dégradation des analytes, il faut choisir une étape de déshydratation douce. Nous nous sommes orientés vers la lyophilisation qui est un processus de déshydratation qui sublime l'eau à basse température ($\approx -80^\circ\text{C}$) et à basse pression ($\approx 0,002$ mBar). Il permet de conserver les analytes dans les solides et d'éviter des dégradations thermiques. Dans notre étude, la lyophilisation de l'échantillon se déroule pendant 48h.

2.2. Homogénéité

L'analyste environnemental est souvent confronté à un problème d'hétérogénéité des échantillons solides. En effet, les échantillons solides peuvent présenter des agrégats de particules, ils peuvent être compactés ou constitués de particules grossièrement dissociées. L'analyse d'un échantillon hétérogène entraînera un manque de représentativité des résultats ainsi qu'une faible répétabilité dues à la distribution différente de particules ou d'éléments (feuilles, branches...) dans l'échantillon traité. De plus, l'extraction sera d'autant plus efficace et rapide que l'échantillon sera finement divisé permettant au solvant de rentrer en contact avec les analytes retenus en surface et à l'intérieur des particules [6, 7].

2.2.1. Broyage

Il est donc nécessaire de réduire au maximum la taille des particules et des éléments, ce qui conditionne l'homogénéité de l'échantillon. En outre, l'extraction sera d'autant meilleure que le solvant pourra être facilement en contact avec une grande surface d'échantillon. Il existe une grande variété de systèmes de broyage, nous avons choisi un broyage par couteaux. Le broyage se déroule par pulses de 3 secondes afin de ne pas chauffer l'échantillon et dure environ 10 minutes.

2.2.2. Tamisage

Suite au broyage, l'échantillon peut présenter des graviers ou autres éléments hétérogènes (morceaux de bois, feuilles, plastiques ...). Comme recommandé par Richter et al. [7] ainsi que par le constructeur de l'ASE 200 (Accelerated Solvent Extraction) sur lequel les extractions ont été réalisées, Dionex [6], la taille des particules doit être inférieure à 0,5 mm afin que tous les agrégats soient en contact avec le solvant, nous avons donc tamisé l'échantillon à 220 μm .

2.2.3. Utilisation de la Terre de diatomées

L'utilisation de terre de diatomées, matériau inerte et finement divisé, permet d'améliorer les échanges liquide-solide et d'éviter un compactage de l'échantillon lors du processus d'extraction. Un matériau inerte ne doit apporter aucune pollution à l'extrait collecté, ni même modifier ses caractéristiques. Nous avons évalué son utilisation en procédant à un dopage de terre de diatomée pure que nous avons comparé à une extraction de référence dopée après extraction selon les conditions optimisées présentées dans le paragraphe 3.5. Les taux de récupérations sont tous supérieurs à 90%. Aussi, nous effectuons une extraction blanche de terre de diatomée à chaque début et fin de séquence afin de suivre la variation de l'état de l'extracteur et de l'effet mémoire au cours du temps.

Nous avons mélangé à l'échantillon (1 à 2 g de boue sèche ou 5 g de sédiments), environ 5 g de terre de diatomées, à l'aide d'une spatule à l'intérieur de la cellule. Le mélange des deux solides est ensuite tassé puis la cellule fermée pour être extraite.

3. Protocole d'étude de l'extraction

L'évaluation de l'extraction de polluants organiques à partir des matrices environnementales solides représente une tâche délicate, principalement par le manque d'échantillons de référence. Pour ce faire, nous devons procéder à l'élaboration d'un modèle par dopage d'un échantillon. Bien souvent, ce modèle ne reflète pas les interactions réelles que subissent les molécules recherchées, absorption, adsorption, liaisons fortes avec les pores de la matrice. Les précédents travaux [8] ont montré que le dopage par ajout d'une solution étalon produit une surestimation des taux de récupération calculés due aux limitations diffusionnelles et cinétiques du processus d'absorption que subissent les analytes mis en contact artificiellement avec la matrice. Il est donc essentiel que les contaminants soient dans des conditions similaires que celles de l'environnement.

3.1. Procédure de dopage

La procédure de dopage d'un sol se fait principalement par dépôt d'un spot d'une quantité connue d'analytes en solution [9-11] ou par pesée d'une masse connue d'échantillon en suspension dans un solvant organique dopé en étalons à une concentration fixée [8, 12-14]. Enfin, il est nécessaire de laisser reposer l'échantillon dopé à température ambiante au minimum quelques heures avant l'extraction afin de permettre l'absorption des molécules sur la matrice [14]. L'absorption des analytes est en partie fonction de leur log Kow (annexe XIII). Ainsi, ces conditions sont requises afin de se rapprocher d'échantillons réels dopés avec tous les analytes dans le but d'optimiser les paramètres de l'extraction.

3.1.1. Dopage par solution organique

Cette procédure de dopage présente plusieurs avantages, tels que la mise en contact de la globalité de l'échantillon avec les analytes ainsi que d'une durée d'adsorption élevée ; ceci permettant de se rapprocher d'un modèle d'échantillon réel. Néanmoins, ce protocole peut être long et il demande plus de manipulations qu'une procédure par dépôt d'une solution d'analytes.

Nous avons procédé au dopage d'une masse de 5 grammes de boue lyophilisée dans 20 mL d'acétone dopée à hauteur de 8 ppm pour les alkylphénols et 0,11 ppm pour les pesticides. Le temps de contact choisi est de 24 h sous agitation à l'aide d'un barreau aimanté puis l'échantillon est mis à évaporer sous hotte pendant 24 h. Ce temps est nécessaire et le poids total a été suivi afin d'attester la complète évaporation du solvant.

3.1.2. Dopage par dépôt

Le dopage d'une matrice solide par dépôt de quelques dizaines de microlitres sur la masse d'échantillon extraite est une procédure rapide et directe. On peut supposer que les phénomènes d'absorption et d'adsorption sont beaucoup plus faibles de cette manière là. Alors, l'extraction de composés non fixés sur la matrice par interactions physico-chimiques (Van der Waals, interactions polaires, dipôles-dipôles) avec les interférents est alors plus facile que sur un échantillon réel.

La procédure de dopage par spot est basée sur le dépôt de 30 μ L d'une solution des étalons à des concentrations identiques que pour la procédure de dopage par une solution organique (8 ppm pour les

APs et 0,11 ppm pour les pesticides). Le dépôt est fait sur l'échantillon au centre de la cellule d'extraction.

3.1.3. Comparaison et choix de la procédure de dopage

Nous avons appliqué les mêmes paramètres d'extraction pour chacune des méthodes de dopage (température, 80°C, pression, 40 bars, 1 cycle, 5 minutes, 1/1, v/v acétonitrile/isopropanol) et l'expérience est répétée 3 fois. Les résultats sont regroupés sur la figure 3-2 et permettent de comparer les taux d'extraction et les écarts-types sur la méthode obtenus en fonction de la méthode de dopage.

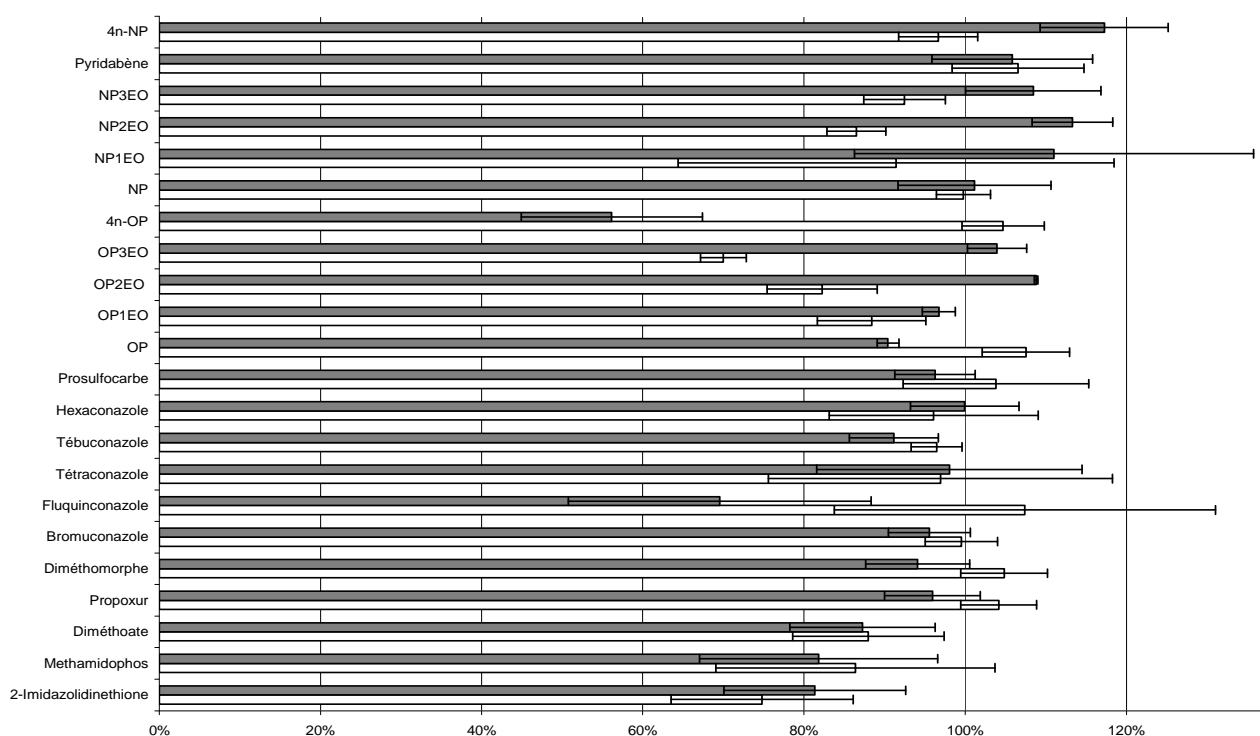


Figure 3-2 : Taux de récupérations obtenus pour un dopage par solution organique (blanc) ou par dépôt d'un spot d'une solution étalon (gris)

De manière générale, ils semblent que tous les composés ne sont pas affectés de la même manière par la procédure de dopage. Les différences les plus remarquables sont celles obtenus pour les alkyphénols linéaires (4n-OP et 4n-NP), les formes éthoxylates et pour le fluquinconazole. La méthode de dopage par spot donne de meilleurs rendements d'extraction pour les formes éthoxylates des OPs et NPs et des NPs non éthoxylés. Ceci peut s'expliquer par l'absorption forte de ces composés sur la matrice lors du dopage par une solution, le temps de contact et les conditions générales de cette méthode favorisant les interactions solide-analytes. Par contre, des taux de récupération plus faibles sont observés pour un dopage par spot pour les OPs non éthoxylés et le fluquinconazole.

En conclusion, nous avons orienté notre méthode de dopage sur un dépôt par spot. Ce protocole présente l'avantage de réduire la complexité du schéma analytique comparativement à un d'un dopage par solution organique permettant ainsi d'augmenter la reproductibilité de la méthode d'analyse.

3.2. Etude statistiques de l'extraction – Plan d'expériences

L'extraction accélérée par solvants (PLE) est une technique d'extraction solide-liquide qui combine une température et une pression élevée rendant l'extraction rapide et efficace. Cette efficacité ne sera atteinte que si les paramètres opérationnels sont choisis correctement. Ainsi, les paramètres physiques déterminants d'une extraction par solvant sous pression et à chaud sont la température, la pression, la durée d'extraction et le nombre de cycle. Pour obtenir une représentation complète du processus et optimiser au mieux les différents paramètres, nous avons réalisé un plan d'expériences à l'aide d'une matrice factorielle complète. Au préalable, nous avons choisi un domaine expérimental défini par une valeur haute, une valeur basse et une valeur au centre pour chacun des 4 critères de l'extraction qui seront étudiés en fonction des caractéristiques physico-chimiques de nos analytes.

3.2.1. Choix des paramètres d'extraction

3.2.1.1. Solvant

Le solvant employé pour une extraction solide-liquide doit permettre la désorption et la solubilisation des analytes. Pour cela, un mélange de solvants peut être employé, particulièrement dans le cadre de l'extraction de composés de polarité différente. De plus, il doit être compatible avec les étapes post-extraction (évaporation-purification) et extraire au minimum les interférents de la matrice.

Les solvants ont été choisis volontairement à partir de l'observation visuelle seule des extraits obtenus grâce à l'acétate d'éthyle, l'hexane, le méthanol, l'acétone, l'acétonitrile et l'isopropanol. Parmi les extraits recueillis, les moins colorés, supposés contenir le moins de substances humiques/tanins, sont ceux obtenus à partir d'acétonitrile et d'isopropanol. De plus, ces deux solvants sont intéressants car ils présentent des indices de polarités relativement différents (Annexe X, $\Delta = 1,9$) en adéquation avec une extraction multi-familles et les composés que nous étudions sont solubles dans ceux-ci [15, 16]. La composition du solvant d'extraction choisie est donc un mélange acétonitrile/isopropanol, 1/1, v/v.

3.2.1.2. Température

La température est un des paramètres les plus importants dans un protocole PLE. La viscosité du solvant diminue lorsque l'on augmente la température ce qui permet aux solvants de pénétrer dans tous les pores des particules d'échantillons et de solubiliser les analytes. La température ajoute également de l'énergie à l'extraction nécessaire à la rupture des liaisons les plus fortes, à savoir les liaisons analytes-matrice.

Pour choisir les valeurs maximales et minimales de températures utiles dans le cadre d'une extraction multirésidus, il est essentiel de prendre en compte les dégradations thermiques des analytes ainsi que le comportement de la matrice vis-à-vis de ce paramètre par coextraction des interférents.

3.2.1.2.1. Dégradations thermiques

Une étude de la dégradation thermique du propoxur dans la chambre de vaporisation a été décrite dans le chapitre II. On peut supposer à juste titre que cette même dégradation en phase solvant puisse avoir lieu lors de l'extraction. Les températures de la chambre de vaporisation étudiées ont été de 150, 200 et

250°C ; nous avons alors réalisé un suivi cinétique de la dégradation du propoxur en solution dans le méthanol et dans un mélange isopropanol/acétonitrile (1/1, v/v). Pour constater l'effet de la température sur ce composé, nous avons chauffé la solution par palier de 10°C maintenu 10 minutes, un prélèvement est effectué à la fin des 10 minutes. Puis un palier de 2 heures à la température de l'ébullition du solvant est maintenu. Finalement, aucune dégradation n'a été observée à 65°C (point d'ébullition du méthanol), ni à 70°C (point d'ébullition du mélange isopropanol/acétonitrile). Néanmoins, en ce qui concerne les APs, Petrovic [17] rapporte des pertes thermiques élevées en NPs et OPs lorsque la température dépasse les 100°C lors de l'extraction.

En conclusion, nous avons choisi de ne pas dépasser une température de 80°C.

3.2.1.2.2. Comportement de la matrice à haute température

La matrice "boues" est une matrice riche en substances organiques et plus particulièrement en lipides, triglycérides. Les triglycérides sont transformés par hydrolyse sous pression et à chaud en stéarate majoritairement (acide octadécanoïque, $C_{18}H_{36}O_2$), c'est le processus que l'on observe par PLE lorsque la température dépasse 100°C à basse pression ($P < 20$ bars) et pour une pression supérieure à 140 bars ($T \geq 40^\circ C$). Nous avons mis en évidence ce phénomène par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) du résidu centrifugé. Ces analyses sont réalisées en mode ATR (Attenuated Total Reflection) sur un appareil Nicolet Nexus, avec un cristal de germanium et une source Global carbure de silicium (SiC) refroidie à l'azote. Le détecteur utilisé est un MCT (Mercure Cadmium Tellure) refroidi à l'azote liquide. La gamme spectrale balayée est de 4000 à 650 cm^{-1} , la résolution est de 4 cm^{-1} . Les échantillons sont analysés à température ambiante avec une accumulation de 256 spectres. On a ainsi observé le spectre IR par microscopie ATR présenté sur la figure 3-3 :

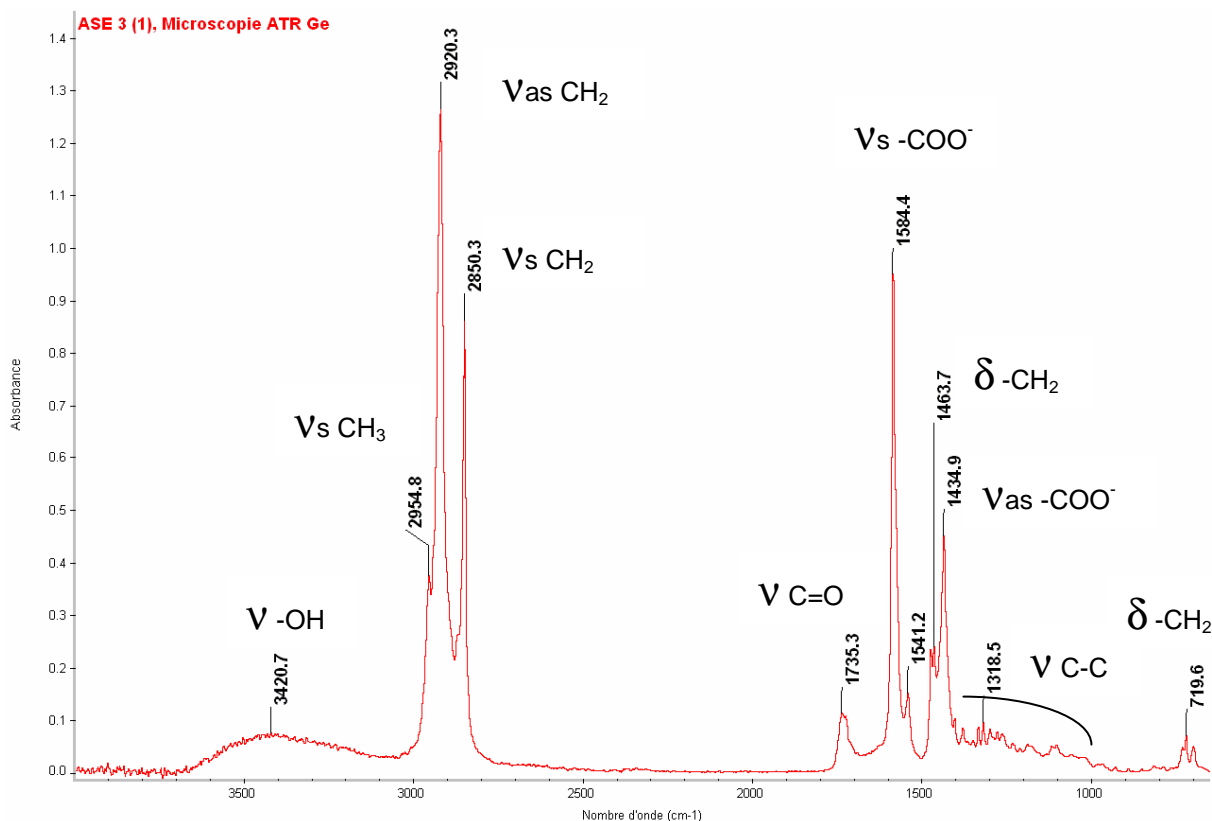


Figure 3-3 : Spectre IR du résidu obtenu après PLE d'une boue à une pression supérieure ou égale à 140 bars et une température supérieure ou égale à 100°C

Le spectre montre la présence d'une fonction carboxylate ($1434\text{-}1584\text{ cm}^{-1}$) et d'un carbonyle (1735 cm^{-1}) et de nombreux CH_2 ($2850\text{-}2920\text{ cm}^{-1}$). Les liaisons C-C peuvent être mises en évidence par les fréquences comprises entre 1000 et 1350 cm^{-1} . Une teneur résiduelle en eau ou la présence de groupes carboxyliques à l'état de trace peuvent être détectées par la bande de fréquences aux alentours de 3420 cm^{-1} .

Pour attester l'interprétation que nous proposons, nous avons comparé le spectre IR obtenu avec une base de données qui nous a donné le résultat que voici à hauteur de 75 % de similitudes.

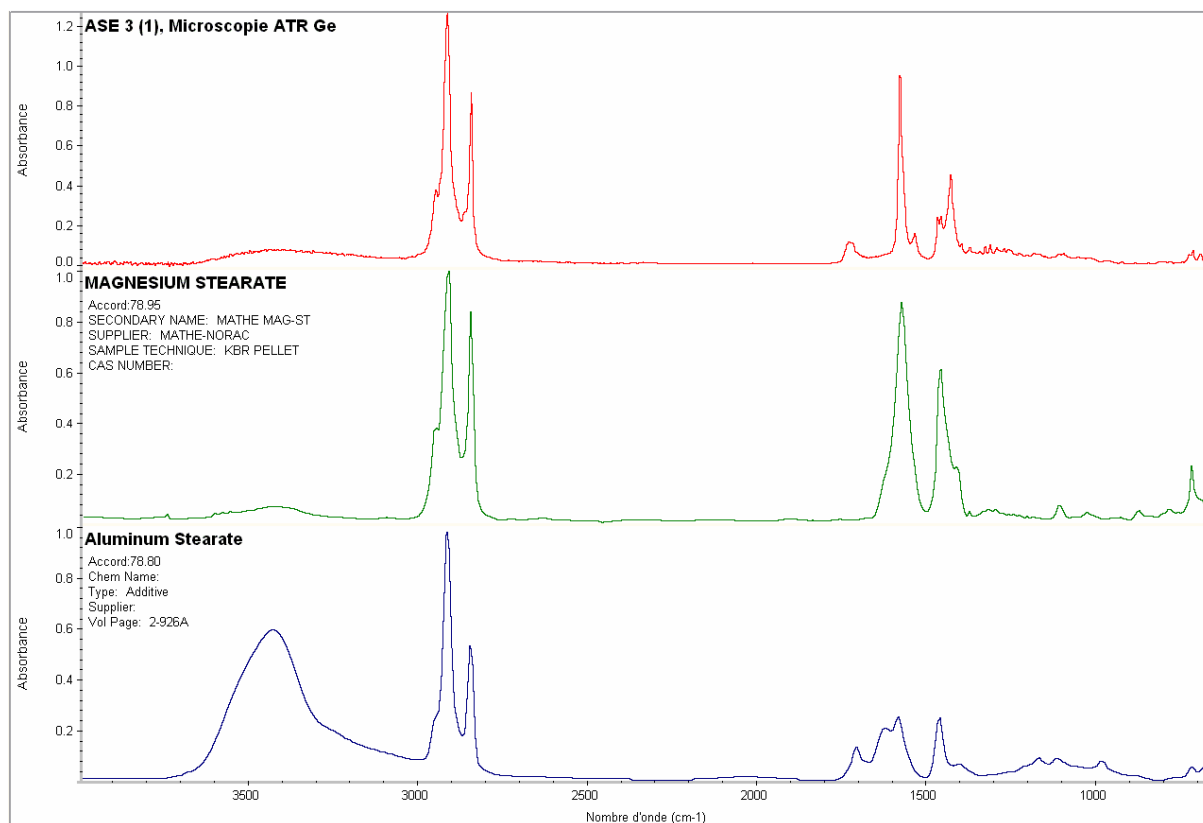


Figure 3-4 : Spectre IR obtenu et comparé avec ceux d'une base de données spectrale pour la recherche et l'identification du résidu

Ces résultats tendent donc à prouver que pour une pression supérieure à 140 bars et une température supérieure à 100°C , les acides gras et en particulier les triglycérides présents dans la matrice sont hydrolysés en stéarate de manière majoritaire et d'autres acides carboxylates. Bien évidemment, le résidu peut être centrifugé et le surnageant collecté, mais pour éviter de perdre des analytes dans le solide hydrolysé et d'avoir recours à une manipulation supplémentaire, nous avons essayé de réduire nos plages de température et de pression afin de déterminer si les récupérations de nos analytes ne seraient pas satisfaisantes avec ces paramètres réduits.

Ainsi, nous avons opté pour une valeur basse de température de 40°C , une valeur au centre du domaine à 60°C et une valeur haute de 80°C .

3.2.1.3. Pression

La pression permet d'utiliser des solvants liquides à une température supérieure à leur température d'ébullition à pression atmosphérique, elle permet également de faciliter la pénétration du solvant à

l'intérieur des particules et pores de l'échantillon difficiles d'accès. Les méthodes proposées pour l'extraction des alkylphénols à partir des boues sont basées sur des pressions comprises entre 30 et 140 bars [17-19]. Nous avons montré que l'hydrolyse des acides gras se produit lors de l'extraction au sein de la cellule à partir d'une pression de 140 bars. Nous fixerons une valeur haute de pression à 120 bars et une valeur basse à 40 bars.

3.2.1.4. Durée et nombre de cycle d'extraction

La durée d'extraction appelée temps statique est souvent augmentée pour des matrices complexes qui présentent de fortes rétentions des analytes dans les pores de l'échantillon. Ce paramètre est à étudier en corrélation avec le nombre de cycles, ces deux variables étant directement liées

3.2.1.4.1. Durée – Temps statique

L'étude bibliographique a montré qu'il est couramment employé un temps statique de 5 [17-23] ou 10 min [24, 25] pour l'extraction des pesticides et alkylphénols à partir des boues. Pour notre étude nous avons choisi une valeur basse fixée à 5 minutes, un point au centre à 10 minutes et nous avons voulu regarder les résultats obtenus pour un temps d'extraction maximal de 15 minutes.

3.2.1.4.2. Nombre de cycles d'extraction

La variation du nombre de cycle a pour but principal d'introduire du solvant frais, ce qui aide à maintenir un équilibre d'extraction favorable [6]. Un paramètre lié au nombre de cycles est le volume de « flush » qui est exprimé en pourcentage du volume de la cellule. Lorsque deux ou plusieurs cycles sont appliqués dans une méthode, ce volume est alors divisé par le nombre de cycles. En d'autres termes, lorsque le premier temps statique est terminé, un volume de « flush » est introduit dans la cellule et remplace une partie du solvant introduit au début de l'extraction. Ainsi, le solvant et l'échantillon sont maintenus sous pression pour un deuxième temps statique [6]. Ce volume a été fixé par défaut à 100% du volume de la cellule (dans notre étude, cellule de 11 mL) quelles que soient les conditions étudiées. En général, un, deux ou trois cycles suffisent à une extraction efficace des pesticides organochlorés [19-21, 24, 25] et des alkylphénols [17, 18, 22, 23]. Ainsi, nous avons étudié l'impact d'un, deux et trois cycles sur l'extraction de nos analytes à partir des boues.

3.3 Mise en place du plan d'expériences

L'extraction simultanée de composés appartenant à différentes familles de molécules et ayant des propriétés physico-chimiques variées représente un travail délicat et long. Afin d'étudier l'impact sur les taux de récupération de chaque analyte des quatre facteurs que sont la température, la pression, la durée et le nombre de cycles, nous avons décidé de réaliser une matrice factorielle complète 2^4 (16 expériences) avec 4 points au centre du domaine soit un total de 20 expériences. Ce type d'outil méthodologique permet d'étudier les effets des facteurs ainsi que les interactions (cf domaine expérimental, table 3-3 et plan d'expériences tableau 3-4).

Paramètres de l'extraction	valeur basse (-1)	valeur centrale (0)	valeur haute (+1)
Pression (bars), X_1	40	80	120
Température (°C), X_2	40	60	80
Durée (minutes), X_3	5	10	15
Nombre de cycles, X_4	1	2	3

Tableau 3-3 : Domaine expérimental : Valeurs choisies pour les quatre paramètres étudiés pour l'extraction des analytes à partir des boues

Essai	Pression	Température	Durée	Nombre de cycles
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1
15	-1	1	1	1
16	1	1	1	1
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0

Tableau 3-4 : Plan d'expériences : Matrice factorielle complète utilisée lors de l'optimisation de l'extraction des composés recherchés

Nous avons appliqué le protocole d'essai à une masse de boue identique pour chaque expérience et pour éviter un biais quelconque, nous avons réalisé les différentes expériences du plan dans un ordre aléatoire. La masse de boue était fixée à 1 gramme et dopée par dépôt de 30 μL d'une solution étalon correspondant à un dopage de 0,1 à 3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, niveaux de concentration adaptés à la sensibilité des composés. L'extraction est réalisée 48 heures après le dopage correspondant à un temps d'absorption. De la même manière, nous avons procédé, le même jour, à l'extraction d'une même masse boue non dopée qui nous sert de référence. On procède ainsi au dopage d'un extrait de boue obtenu après PLE. La figure 3-5 reprend les étapes clés du protocole expérimental du plan d'expérience.

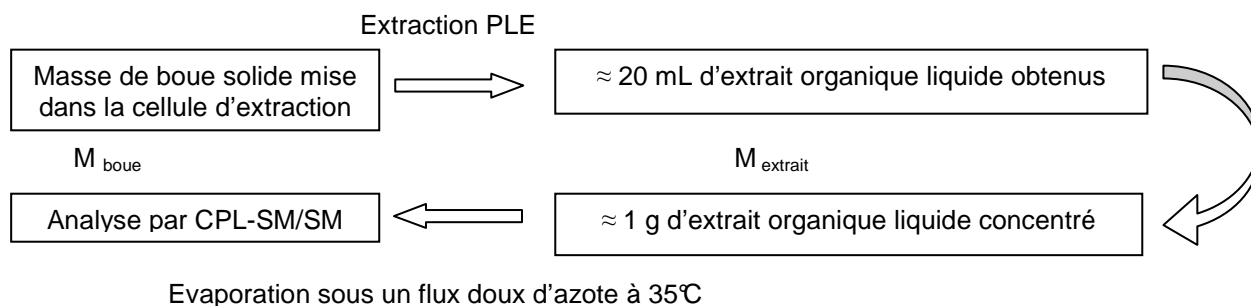


Figure 3-5 : Protocole expérimental du traitement de l'échantillon lors de l'étude des paramètres de l'extraction par PLE

Ces expériences nous permettent de calculer un taux de récupération pour chacun des essais selon l'équation 3-1, avec A_{analyte} l'aire du signal chromatographique, M_{boue} la masse de boue extraite par PLE et M_{extrait} la masse d'extrait organique obtenue.

$$\text{Taux de récupération (\%)} = \frac{\frac{A_{\text{analyte-dopé}} \times M_{\text{bouedopée}}}{M_{\text{extraitdopé}}}}{\frac{A_{\text{analyte-référence}} \times M_{\text{boueref}}}{M_{\text{extraitref}}}} \times 100$$

Équation 3-1 : Calcul des taux de récupération en fonction de la masse de boue solide et de la masse d'extrait organique en phase solvant obtenues

Cette équation prend en compte deux masses bien distinctes, une masse de boue, masse d'échantillon solide mis dans la cellule, et une masse d'extrait, masse extraite sous forme liquide et injectée en CPL-SM/SM. En effet, pour étudier uniquement les paramètres de l'extraction, il a été nécessaire de n'effectuer aucune étape de purification pouvant modifier les rendements en fonction des interférents extraits. C'est pourquoi, les extraits obtenus ne peuvent pas être injectés en CPG sans endommager la colonne et induire une perte de reproductibilité.

3.4 Résultats

3.4.1. Résultats bruts

Les résultats bruts obtenus pour chacun des analytes, exprimés selon leur taux de récupération, sont regroupés dans le tableau présenté en annexe XIV. La CPL nous permet de distinguer les formes diastéréoisomères du diméthomorphe et du bromuconazole, nous les avons numérotés 1 et 2 suivant leur ordre d'éluion chromatographique et comparés afin de vérifier leur comportement vis-à-vis de l'extraction. A la vue de ces résultats, si l'on considère la globalité des taux de récupération, leur moyenne est de 88%, avec une médiane à 90%, ce qui permet d'envisager de trouver un compromis acceptable pour une majorité de composés. L'expérience au centre répétée quatre fois permet de calculer un écart type sur cette extraction (cf annexe XIV) qui est compris entre 4 et 17 %.

La figure 3-6 représente les minimums et maximums obtenus pour chacun des analytes, tout essai confondu, le taux minimum est de 32% pour les 4n-OP et NP obtenus lors de l'expérience 10. C'est d'ailleurs pour cette expérience là que les taux de récupération les plus faibles sont obtenus pour une majorité de composés. Ceci laisse supposer que cette expérience regroupe les valeurs des paramètres étudiés défavorisant le plus l'extraction multi-familles.

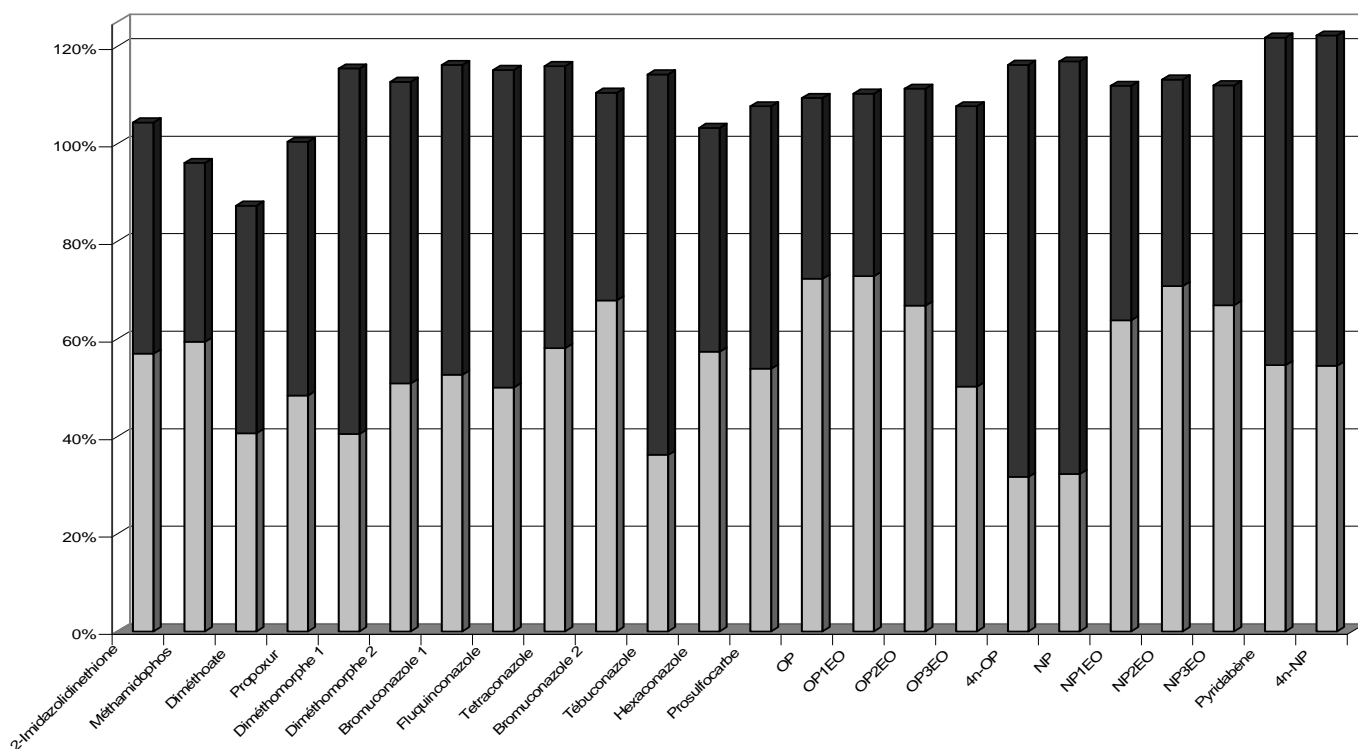


Figure 3-6 : Taux de récupération minimum (gris) et maximum (noir) obtenus lors de l'extraction suivant le plan d'expérience mis en œuvre

Les composés qui présentent les minimums les plus faibles sont le tébuconazole (36%), le 4n-OP (32%) et le NP (32%) mais ces taux ne sont jamais atteints pour ces trois molécules dans les mêmes conditions d'essais. Enfin, aucun composé ne présente de rendements d'extraction maximum inférieurs à 80%.

3.4.2. Exploitation des résultats statistiques

L'étude statistique menée sous la forme d'un plan d'expériences [26] est bâtie sur une matrice factorielle complète à deux niveaux qui permet d'estimer les effets principaux (coefficients du premier degré) et les termes d'interactions (synergiques).

$$\text{Taux de récupération} = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{14}X_1X_4 + b_{23}X_2X_3 + b_{24}X_2X_4 + b_{34}X_3X_4 + b_{123}X_1X_2X_3 + b_{124}X_1X_2X_4 + b_{134}X_1X_3X_4 + b_{234}X_2X_3X_4 + b_{1234}X_1X_2X_3X_4$$

Si dans un premier temps on se contente des termes du premier degré, on peut représenter le modèle selon l'équation simplifiée :

$$\text{Taux de récupération} = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4.$$

La figure 3-7 représente les effets principaux pour la pression (b_1) et la température (b_2), la figure 3-8 les coefficients du premier ordre pour la durée statique (b_3) et le nombre de cycle (b_4). Plus la valeur absolue du coefficient est grande plus l'influence sur le taux de récupération du composé étudié est grande, le signe permettant de déduire le sens de variation de l'effet modélisé.

Les interactions représentées par les coefficients d'interaction du premier ordre sont représentés en annexe XIV. Rappelons qu'il y a effet d'interaction entre deux facteurs si l'effet d'un des facteurs sur le rendement (ici, la réponse étudiée) est dépendant du niveau de l'autre.

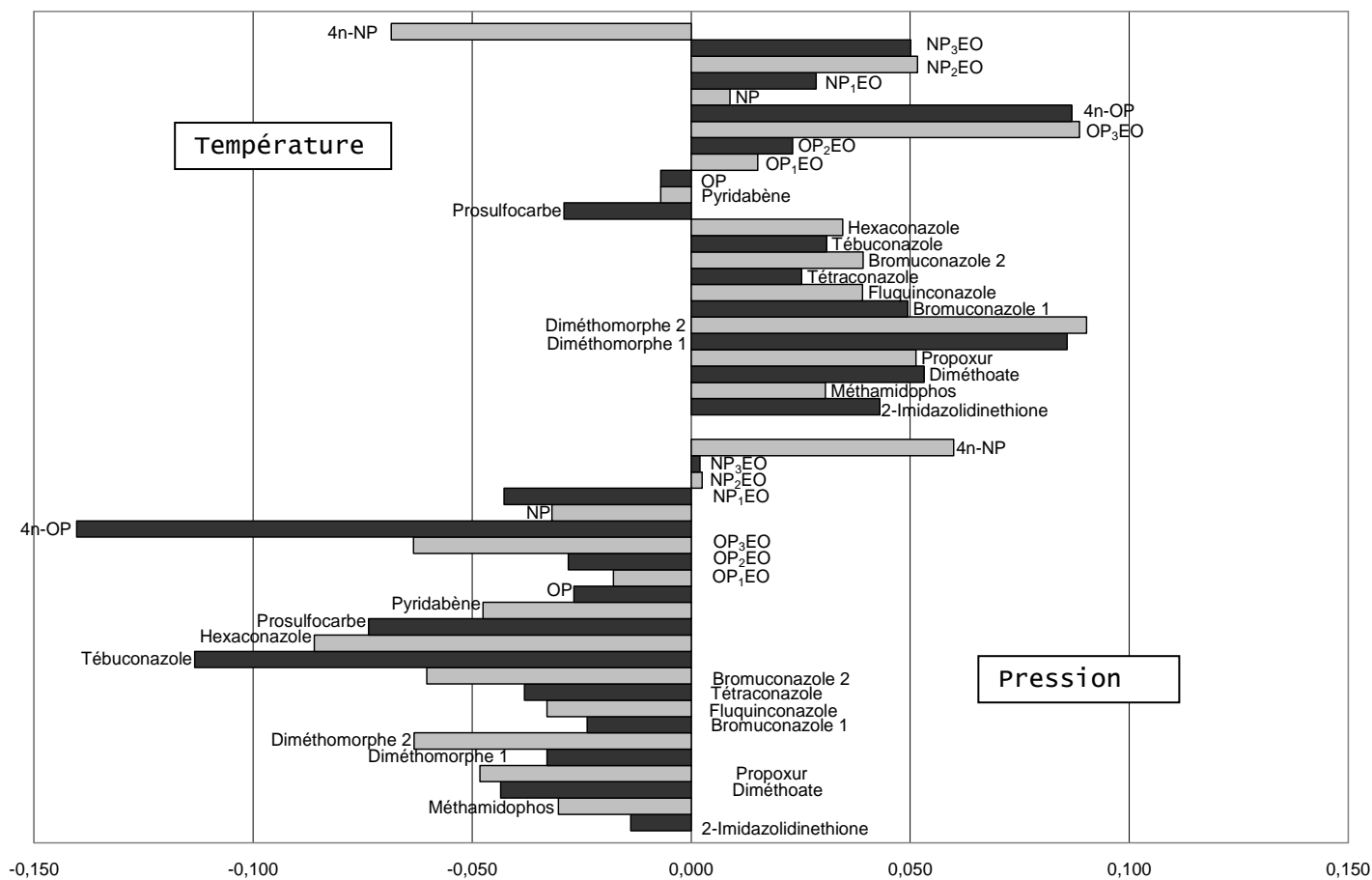


Figure 3-7 : Coefficients du premier degré b₁ (Pression) et b₂ (Température) calculés pour chacun des composés

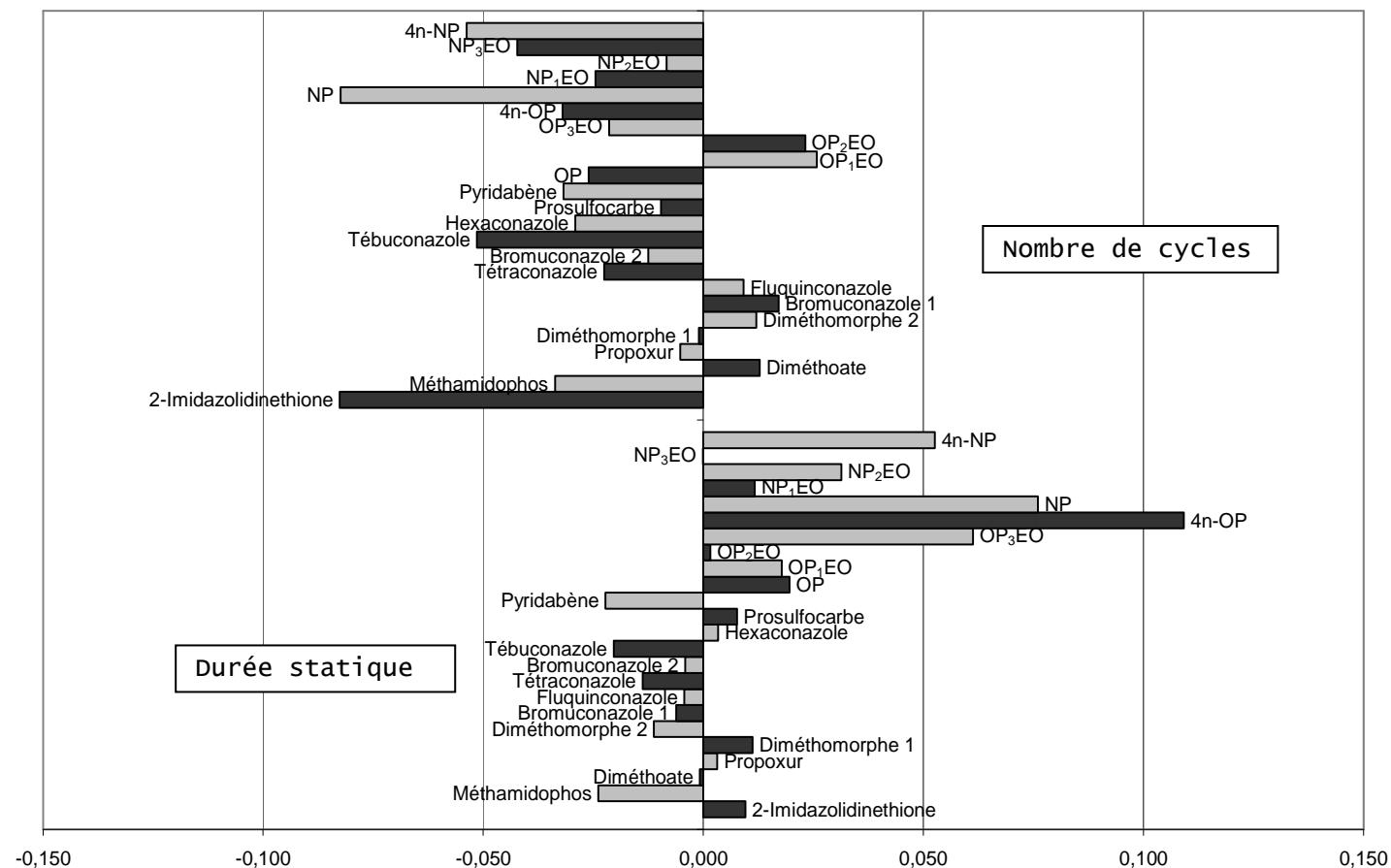


Figure 3-8 : Coefficients du premier degré b₃ (Durée statique) et b₄ (Nombre de cycles) calculés pour chacun des composés

La figure 3-7 montre très clairement un effet négatif de la pression pour tous les composés sauf les NP₂EO, NP₃EO et 4n-NP, ce qui revient à dire que plus la pression est forte plus les taux de récupération seront faibles. En ce qui concerne la température, l'effet est plus varié même si une grande majorité des composés (18 composés sur 22 étudiés) sont beaucoup mieux extraits à la température haute du domaine d'étude (80°C). Les rendements d'extraction du prosulfocarbe, pyridabène, OP et du 4n-NP sont beaucoup plus faibles lorsque l'on se situe à haute température.

La figure 3-8 permet de mettre en évidence des variations beaucoup plus diverses lorsque l'on fait varier la durée du cycle et le nombre de cycles. On remarque également que ces effets sont plus faibles en valeur absolue ($I_{max1} = 0,109$) donc moins significatifs que les effets dus à la température et la pression ($I_{max1} = 0,140$). D'une manière générale, la durée statique semble favorable à l'extraction des APs et APnEOs mais défavorable (ou faiblement favorable) à celle des pesticides. Le graphique représentant le coefficient b_4 , soit le nombre de cycles, est relativement homogène et permet de conclure qu'un nombre de cycles élevés est néfaste à l'extraction de nos analytes, seuls quelques uns comme les OP₂EO et OP₃EO ainsi que quelques pesticides (fluquinconazole, bromuconazole 1, diméthomorphe 2 et diméthoate) présentent un coefficient faiblement positif vis-à-vis de ce paramètre.

Les effets obtenus sur les six termes du second ordre supérieurs (b_{ij} - annexe XIV) correspondant aux effets d'interaction du premier ordre n'apportent pas de grandes variations sur les rendements d'extraction. La simple représentation graphique des figures de l'annexe XIV permet déjà de mettre en évidence que la température et la durée statique interagissent ainsi que la pression et la température. Dans le cas de notre étude multi-familles, une exploitation plus classique à l'aide des graphiques des interactions reviendrait à représenter graphiquement six interactions pour chacun des 22 analytes ; nous avons considéré dans ce travail qu'avec les coefficients du premier ordre nous avons une bonne tendance des variations des rendements en fonction des 4 paramètres étudiés.

3.5. Méthode d'extraction optimisée

A partir des résultats du plan d'expériences qui donne les variations des 4 paramètres sur le rendement de l'extraction nous avons fixé la pression à 40 bars, la température à 80°C, l'extraction est réalisée sur un cycle. La durée statique ayant une significativité faiblement négative sur les pesticides et une forte significativité positive sur les rendements d'extraction des APs et APnEOs, il semble raisonnable d'adopter un temps statique de 10 minutes. Toutes ces informations sont regroupées dans le tableau 3-5.

Paramètres	Valeur	Niveau
Pression (bars)	40	+1
Température (°C)	80	-1
Temps statique (minutes)	10	0
Nombre de cycle	1	-1

Tableau 3-5 : Paramètres optimum pour l'extraction des 22 composés sélectionnés par PLE

4. Purification de l'extrait

Le principal problème de l'extraction accélérée par solvant (ASE) et des autres techniques d'extraction par solvant est la faible sélectivité des analytes vis à vis de la matrice et de ses interférents. Durant l'étape d'extraction des échantillons solides de nombreux composés sont co-extraits avec les molécules recherchées. Une ou plusieurs étapes de purification appelées « clean-up » sont nécessaires pour la détection et la quantification des micropolluants sans interférence et pour minimiser l'effet de matrice.

Pour étudier cette étape, nous avons porté notre intérêt sur des protocoles de purification utilisant la Chromatographie d'Exclusion Stérique (CES), puis la chromatographie flash sur gel de silice et l'extraction liquide-liquide. Enfin, nous avons appliqué le protocole SPE de purification des extraits aqueux (cf chapitre II) à l'extrait obtenu après PLE.

4.1. Chromatographie d'Exclusion Stérique (CES)

L'extrait collecté après PLE contient de nombreuses molécules à haut poids moléculaire, telles que les substances humiques, tanins ou polymères végétaux dégradés (cellulose, lignine) qui peuvent être séparés de nos molécules d'intérêt de plus faible poids moléculaire $< 400 \text{ g.mol}^{-1}$. Dans ces conditions, la CES peut être utilisée en technique de purification d'échantillon [9, 27-31].

Le système CES sur lequel nous avons travaillé est une chaîne Varian 9012 avec une détection UV-visible 9050 et un détecteur à indice de réfraction HP1047-A. Le système d'injection est constitué d'une boucle de 500 μL . Nous avons utilisé un jeu de colonnes Envirogel GPC Cleanup de tailles 19 par 150 mm et 19 par 300 mm connectées en série et précédées par une pré-colonne de 4,6 par 30 mm. La phase stationnaire est composée de copolymère styrène divinylbenzène de diamètre de pores de 100 Å et d'une taille de particule nominale de 15 μm . La composition de la phase éluante est un mélange acétate d'éthyle/cyclohexane, 1/1, v/v à un débit de 4 mL.min^{-1} . Une injection de 100 μL de toluène permet de déterminer le volume mort du système, $t_{\text{toluène}} = 23$ minutes. L'acquisition réalisée à 254 nm est donnée sur la figure 3-9.

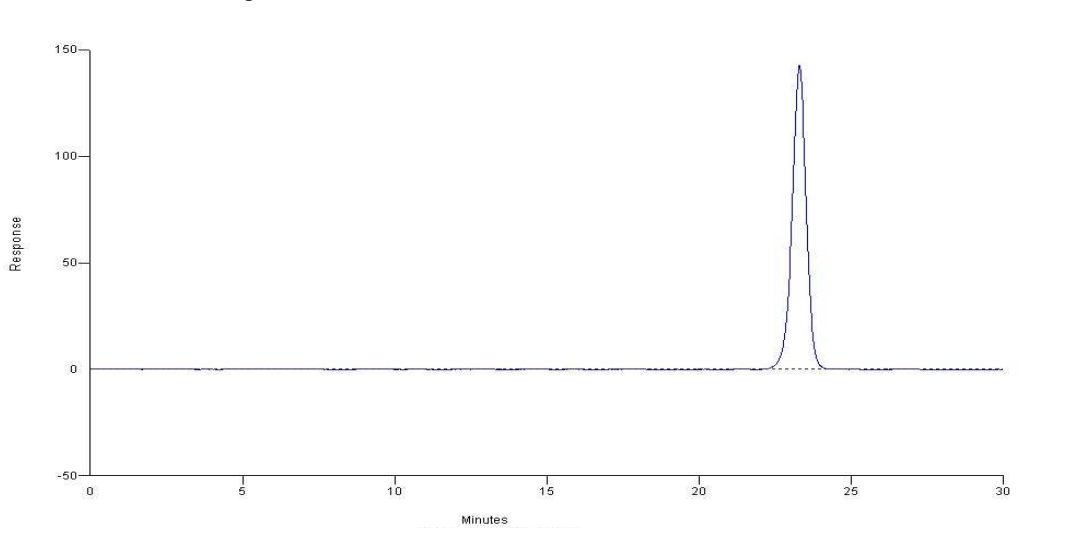


Figure 3-9 : Chromatogramme CES-UV (254 nm) d'une injection de toluène

Pour détecter les analytes dans l'extrait de boue, nous avons étudié le spectre d'absorption UV-Visible d'une solution de chaque substance solubilisée dans la phase éluante sur le domaine [190-500] nm. Ce travail a été effectué sur un spectrophotomètre UV-visible HP 8453. Les longueurs d'onde mesurées dans la phase mobile sont reportées sur l'annexe XIII.

Afin de déterminer les temps de rétention de nos composés dans un extrait, nous avons chromatographié chaque substance indépendamment puis en mélange et enfin un extrait de boue dopé. Ces expériences nous permettent de déterminer les temps de rétention de chaque groupe/famille d'analytes et d'identifier le temps durant lequel ils seront collectés. Les chromatogrammes sont représentés ci-dessous.

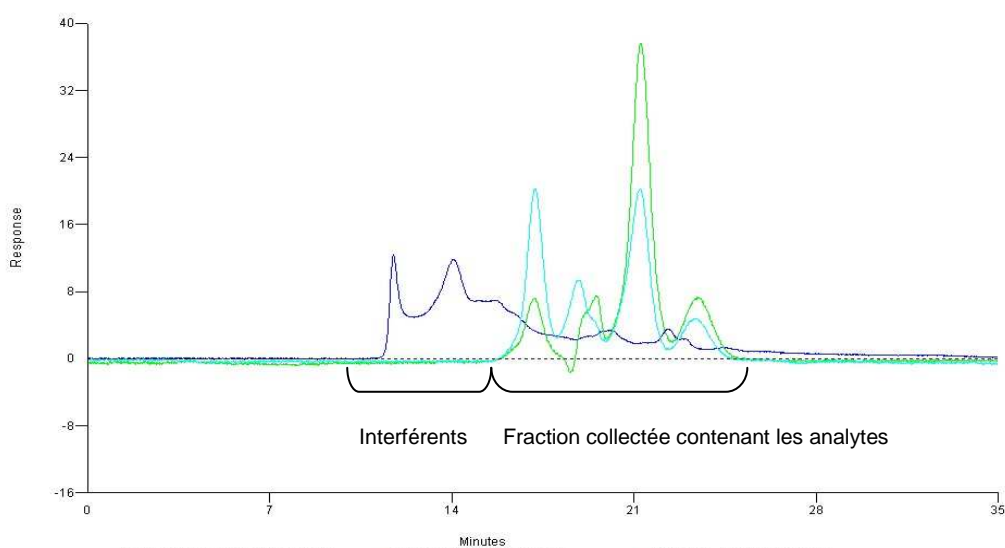


Figure 3-10 : Chromatogramme CES-UV (254 et 278 nm) d'un mélange étalon à 5 ppm (bleu turquoise et vert) et d'une boue non dopée (bleu foncé)

Les analytes sont collectés de 16 à 26 minutes dans un ballon à fond conique. Cette fraction est ensuite évaporée sous vide puis concentrée à 300 μ L. Les fractions obtenues pour un extrait dopé avant CES à 4 ppm et un extrait dopé après CES à 4 ppm n'ont pas permis d'atteindre des rendements de purification satisfaisants, 32 % au maximum.

Cette étude devra être complétée par d'autres expériences, notamment l'emploi d'une boucle d'injection plus grande, 1 mL permettrait d'injecter un volume satisfaisant et d'obtenir des purifications acceptables.

4.2. Chromatographie flash

La chromatographie flash est une technique que nous avons déjà mise en œuvre lors de la purification de APnEOs. Le but étant de retenir les interférents polaires de la matrice tout en collectant nos analytes dans la phase éluée. La silice employée est de granulométrie 0,063 à 0,200 mm et de 70 à 230 de mesh. Le solvant employé est un mélange dichlorométhane/méthanol, 1/1 (v/v). Une masse de 10 à 20 g de florisil conditionnée dans 20 mL de solvant est répartie dans une colonne en verre.

Un extrait de boue dopée à 2 ppm est concentré à 2 mL pour être déposé en tête de colonne. 50 mL du même mélange de solvant permet d'éluier les composés qui sont collectés dans 10 fractions différentes

suivies par Chromatographie sur Couche Mince (CCM). Les fractions contenant les analytes sont regroupées et évaporées pour être concentrées à 250 μL dans le THF. L'analyse de celles-ci nous a permis de calculer des taux de récupération faibles et extrêmement variables, notamment des taux inférieurs à 20% pour une majorité de composés et un écart-type supérieur à 25% entre chaque manipulation et chaque échantillon répétées 3 fois.

Pour évaluer l'effet du solvant sur la chromatographie flash, nous avons également expérimenté un conditionnement et une élution par un mélange hexane/acétone, 1/1, v/v qui nous a donné des rendements plus faibles voire nuls pour le méthamidophos et le 2-imidazolidinethione.

4.3. Extraction liquide-liquide

Dans le contexte d'une méthode de purification, l'extraction liquide-liquide consiste à faire passer les analytes d'un solvant dans un autre solvant qui les solubilise mais pas les interférants. Ces derniers sont représentés essentiellement par les substances humiques et les tanins co-extraits lors de l'extraction sous pression et à chaud. Les substances humiques peuvent être divisées en trois fractions principales basées sur leur solubilité dans les acides et/ou les bases. La fraction soluble dans les acides et les bases s'appelle acide fulvique. Celle qui est soluble dans les bases mais précipite dans les acides est l'acide humique, et celle qui est insoluble dans les acides et les bases est l'humine [32]. Les tanins sont des composés solubles dans l'eau, l'acétone et l'alcool mais insoluble dans le benzène, l'éther et le chloroforme.

A partir de ces données, on déduit que l'extrait doit être en phase aqueuse, ce qui n'est pas le cas lors de notre étape d'extraction par un mélange acétonitrile/isopropanol, 1/1, v/v. Il est alors nécessaire de dissoudre l'extrait évaporé au préalable dans un volume d'eau UP. Dans cette situation nous sommes confrontés à la solubilité limitée de certains analytes dans l'eau (cf annexe XIII). En effet, le passage en phase aqueuse implique que la quantité de polluants absorbée sur la masse de boue extraite est inférieure à la solubilité dans l'eau. Par exemple, la solubilité dans l'eau du p,p'-DDD est de 0,1 mg.L^{-1} , celle du pyridabène de 12 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ce qui offre une limite de 0,05 mg et 6 μg par masse de boue extraite reprise dans 500 mL, soit pour 1,5 g de boue extraite une concentration maximale de 34 $\mu\text{g.g}^{-1}$ et de 4 ng.g^{-1} . Néanmoins des extractions liquide-liquide à partir d'un extrait de boue évaporé et repris dans 300 mL d'eau ont été réalisées à partir des solvants préalablement sélectionnés : cyclohexane, heptane, n-hexane, acétate d'éthyle, dichlorométhane ou le toluène. Nous avons également évalué l'ajout d'acide formique pour améliorer l'extraction des composés basiques ou de soude pour les composés acide, ainsi que de chlorure de sodium pour changer le coefficient de partage en rendant les composés organiques moins solubles dans la phase aqueuse et diminuer l'effet d'émulsion observé avec le dichlorométhane.

Les phases organiques collectées ont abouti à une solubilisation des interférents, la forte coloration persiste malgré les répétitions des extractions, 3 fois minimum. Les extraits évaporés et concentrés à 1 mL environ ne sont donc pas purifiés correctement par cette méthode là et n'ont pas pu être injectés en chromatographie.

4.4. Protocole SPE

Durant notre recherche bibliographique, nous avons trouvé plusieurs protocoles [18, 23, 33, 34] rendant compte d'une purification en phase inverse adaptée à la fois aux les matrices aqueuses et aux les matrices solides en particulier les boues de STEP. L'autre approche serait d'effectuer une purification SPE en phase normale telle que nous l'utilisons pour les extraits aqueux.

4.4.1. D'après l'étude bibliographique – polarité des phases inversées

Ces protocoles [18, 23, 33, 34] proposent d'évaporer l'extrait organique liquide obtenu après extraction à un petit volume (souvent inférieur à 1 mL) ou à sec pour le redissoudre totalement dans un volume d'eau UP. Ce nouvel extrait aqueux est ensuite traité par SPE en phase inverse avec un mélange eau/méthanol.

Cette expérience a été effectuée au laboratoire suite à une extraction de 1,5 g de boue sous des conditions douces d'extraction (40 bars, 40°C, durant 5 minutes et sur un cycle) afin d'obtenir une quantité minimale d'interférents co-extraits. Le solvant employé doit être miscible à l'eau si l'extrait n'est pas évaporé à sec, nous avons employé dans ce cas un mélange acétonitrile/isopropanol, 1/1, v/v. Une autre expérience menée suivant les mêmes paramètres PLE mais avec un mélange cyclohexane/acétone, 1/1, v/v a été évaluée et l'extrait évaporé à sec. Les deux extraits ont été dissous dans un volume de 100 mL puis 200 mL et 300 mL d'eau UP. La solution aqueuse obtenue était orangée et trouble, ceci est lié à la présence d'insolubles qui n'ont pas pu être décantés malgré des centrifugations à 5000 trs/min. Comme nous l'avons expliqué auparavant, la limitation de la solubilité de nos analytes en phase aqueuse est une barrière à la quantification des molécules recherchées. Compte tenu de ces observations, nous n'avons pas pu évaluer cette étape qui ne convient pas à notre matrice boue.

4.4.2. D'après le protocole de purification des matrices aqueuses – phase normale

La SPE peut être employée en tant que technique de purification, la phase solide permettant alors de retenir les interférents et d'éluer les analytes que l'on collecte. Nous avons appliqué le protocole développé sur les extraits aqueux (cf chapitre II) à nos extraits de boues. Pour ce faire, nous avons évaporé l'extrait à environ 1 mL puis ajouté 20 mL (4 * 5 mL) d'heptane/acétone dans le but d'obtenir une phase de l'extrait apolaire/polaire (heptane/acétone, 3/7, v/v). Enfin l'extrait est évaporé à environ 1 mL pour être purifié par SPE sur SiOH (500 mg, Phenomenex) suivant le protocole :

Conditionnement : 5 mL de heptane/acétone (3/7, v/v) à 4 mL.min⁻¹

Chargement de l'échantillon et collecte : ≈ 1 mL d'extrait à 1 mL.min⁻¹

Collecte additionnelle : 3 mL de heptane/acétone (3/7, v/v) à 1 mL.min⁻¹

Les rendements de cette étape ont été évalués tout comme ceux calculés pour l'étape de concentration par SPE sur les eaux environnementales, en comparant un extrait de boue dopé et un extrait de boue dopé après l'étape de purification. Les résultats sont représentés sur la figure 3-11.

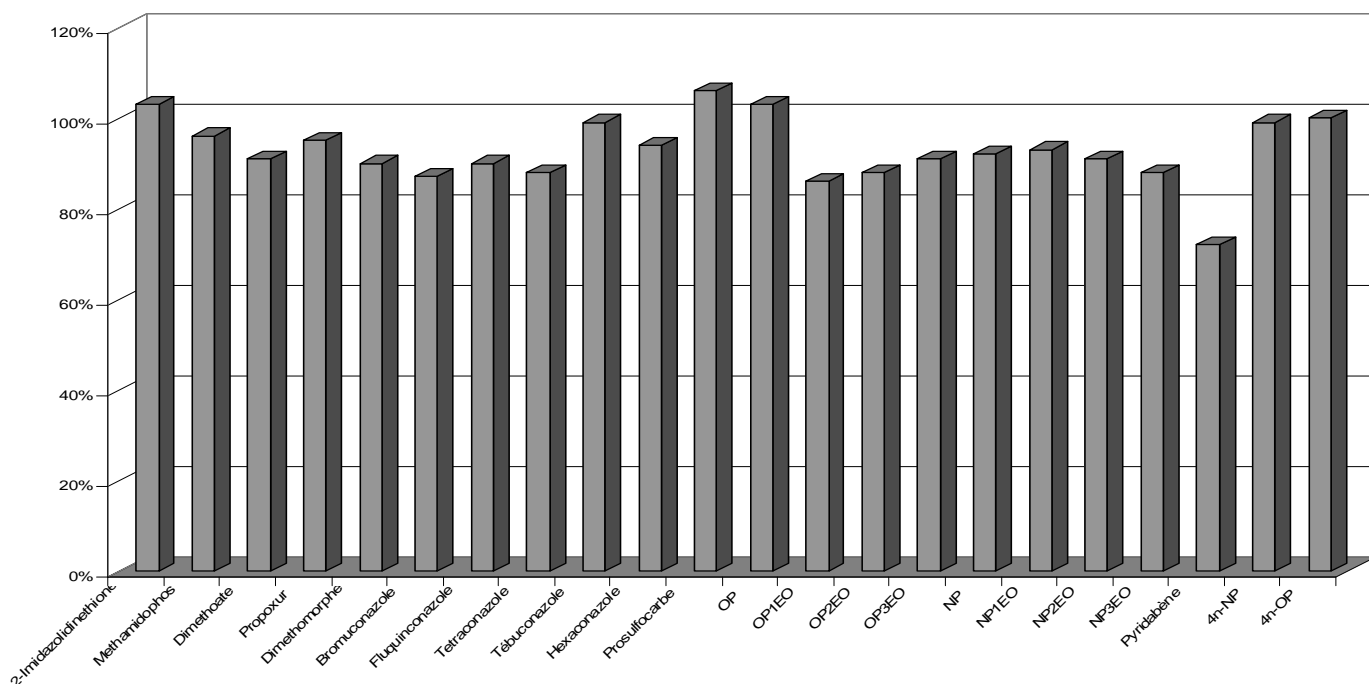


Figure 3-11 : Rendements de l'étape de purification d'un extrait de boue

Les rendements obtenus pour cette étape sont compris entre 72% et 106% et satisfont à notre méthode d'analyse.

La méthode de purification choisie consiste donc à une SPE en phase normale avec les mêmes paramètres optimisés pour les échantillons aqueux. La fraction collectée est ensuite évaporée à 1 ml, volume que nous allons justifier par la réalisation de plusieurs expériences qui sont présentées dans le paragraphe suivant.

5. Etude du protocole d'évaporation de l'extrait

Suite à l'étape de purification de l'extrait, nous avons recherché à concentrer les analytes par évaporation dans un faible volume. Le résidu sec d'un extrait de boue conduit à un dépôt visqueux qu'il est difficile de dissoudre, il est donc nécessaire d'évaporer l'extrait sans le porter à sec. Nous avons observé une différence en ce qui concerne les matières en suspension ou les dépôts extraits, ceux-ci présentent une proportion organique beaucoup plus faible ($\%C+\%H+\%N < 13\%$) et il est alors possible de les concentrer dans un volume de 200 μL de THF comme nous l'avons réalisé sur les extraits aqueux.

Nous avons donc décidé de comparer différents volumes finaux, expérimentalement assimilés à la mesure d'une masse d'extrait. Trois masses ont été évaluées : 0,5 , 1 et 1,5 g. Ces expériences sont réalisées en présence ou non de matrice à partir d'un extrait dont le volume initial est d'environ 20 mL. En effet, à ce niveau d'optimisation de la méthode, plusieurs causes peuvent avoir un impact sur la récupération des analytes et leur détection : l'effet de l'évaporation lié à la perte et à la concentration d'analytes ainsi que l'effet de la matrice lié à la concentration des molécules interférentes.

Pour procéder à cette étude 15 séries d'expériences ont été menées.

Extraits blancs dopés en quantité équivalente avant évaporation

Trois extraits blancs de terre de diatomée sont collectés en sortie d'ASE puis dopés de manière identique (50 μ L d'un mélange de chaque analyte à la LQ) avant évaporation, puis concentrés respectivement à 0,5 , 1 et 1,5 g. Les valeurs expérimentales sont précisément de 0,5165 , 0,8830 et 1,5095 g. L'expérience est illustrée sur la figure 3-12.

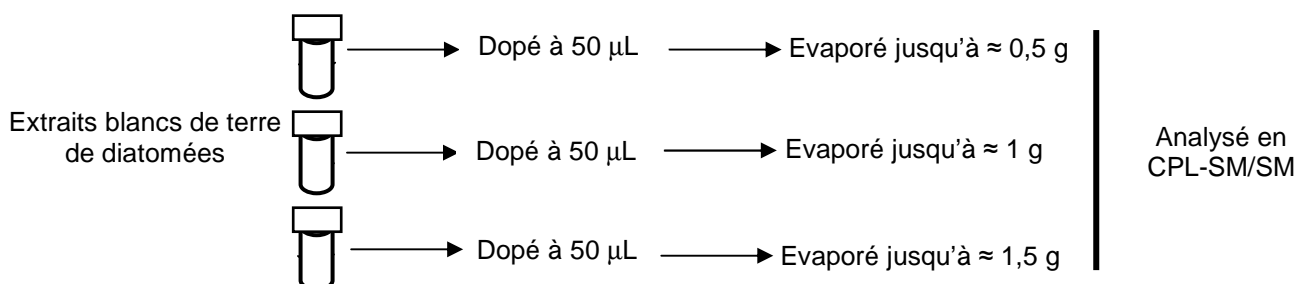


Figure 3-12 : Schéma de l'expérience avec extrait blanc dopé en quantité équivalente avant évaporation

Cette expérience a pour but d'observer la volatilité en fonction de la quantité de dopants et de la durée de l'évaporation. Une régression linéaire a été appliquée sur les aires des signaux obtenus en LC-MS/MS en fonction de la concentration en analytes. Les coefficients de régression de la droite sont reportés dans le tableau 3-6 pour les 3 expériences. Le graphe 3-13 ainsi que ceux de l'annexe XV représentent les rapports d'aires obtenus pour chaque volume final d'évaporation. La droite en pointillés représente le rapport des masses exactes de chaque extrait et peut être comparée directement au rapport calculé pour chaque analyte.

Composés	R ²
Méthamidophos	1,000
Diméthoate	0,999
2-Imidazolidinethione	0,999
Propoxur	0,998
Prosulfocarbe	0,996
Bromuconazole 1	0,995
Fluquinconazole	0,994
Tétraconazole	0,998
Bromuconazole 2	0,998
Tébuconazole	0,995
Hexaconazole	0,998
Diméthomorphe 1	0,998
Diméthomorphe 2	0,998
OP	1,000
4n-OP	0,999
OP ₁ EO	0,988
OP ₂ EO	0,997
OP ₃ EO	0,997
4n-NP	0,986
NP	1,000
NP ₁ EO	0,991
NP ₂ EO	0,994
NP ₃ EO	0,997
Pyridabène	0,992

Tableau 3-6 : Etude de l'effet de l'évaporation sur un extrait blanc dopé à une concentration identique – coefficient de détermination de la régression linéaire

Les résultats montrent une excellente linéarité des aires obtenues pour les trois masses évaluées, avec des coefficients tous supérieurs à 0,99 excepté pour le 4n-NP qui est de 0,988.

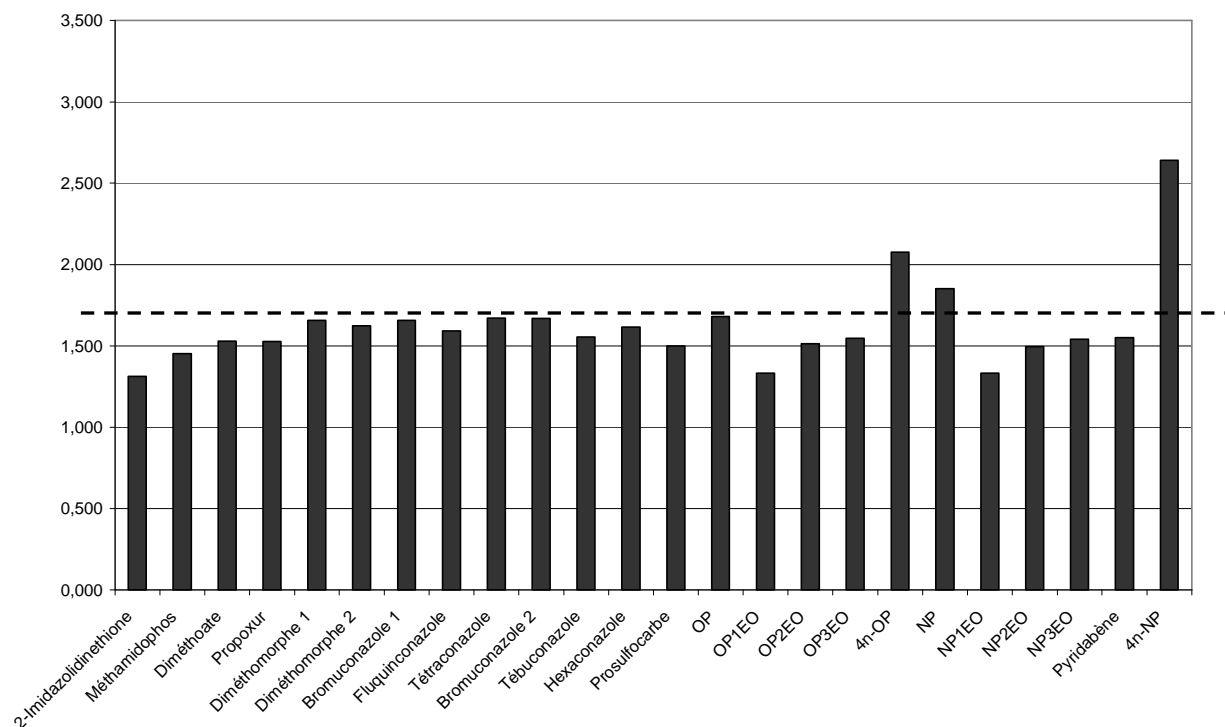


Figure 3-13 : Rapports des aires obtenues lors de l'évaporation d'un extrait blanc dopé identiquement pour une masse finale de 1,5 g et 1 g, droite en pointillés représente le seuil théorique situé à 1,70

On constate que tous les composés sont détectés en rapport avec le seuil théorique quel que soit le volume d'évaporation. Ce qui revient à dire qu'aucune perte sensible des analytes est observée si l'on évapore une quantité identique de dopants à 0,5 g jusqu'à 1,5 g en l'absence de matrice. Le 4n-NP donne une valeur très éloignée de la valeur seuil, ceci peut être dû à la faible sensibilité que l'on a sur ce composé impliquant une plus grande incertitude sur l'aire. En conclusion, on peut dire qu'il y a donc peu d'effet de l'évaporation à concentration identique des analytes dans un extrait blanc.

Extraits blancs dopés différemment avant évaporation

Nous avons réalisé cette même manipulation mais en faisant varier le dopage en analytes de manière à obtenir une quantité de signal équivalente suivant le volume final. L'extrait blanc qui est évaporé jusqu'à 0,5 g est dopé à 25 μ L, l'extrait qui est évaporé jusqu'à 1 g est dopé à 50 μ L et un dopage à hauteur de 75 μ L pour un volume final de 1,5 g. Les aires mesurées pour chacun des 22 composés sont rapportées à 100% de l'aire maximale. Les mesures de masses expérimentales sont 0,6389 , 0,9557 et 1,4291 g. Ces expériences sont résumées par la figure 3-14 et les résultats sont donnés sur la figure 3-15.

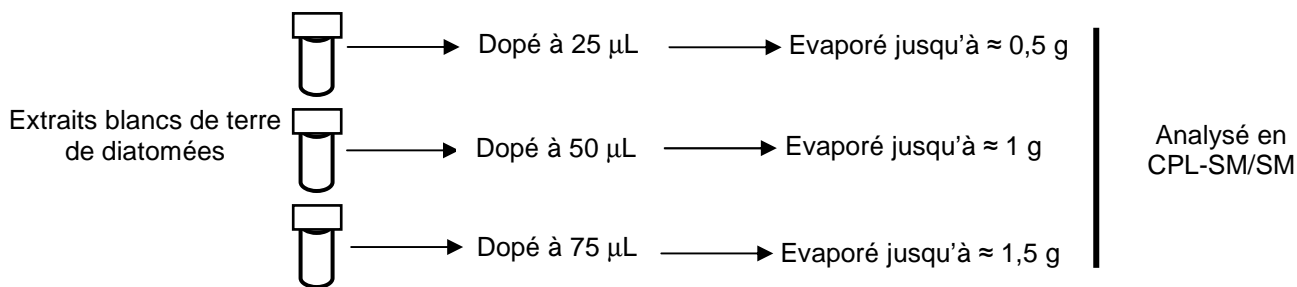


Figure 3-14 : Schéma de l'expérience avec extrait blanc dopé en quantité différente avant évaporation

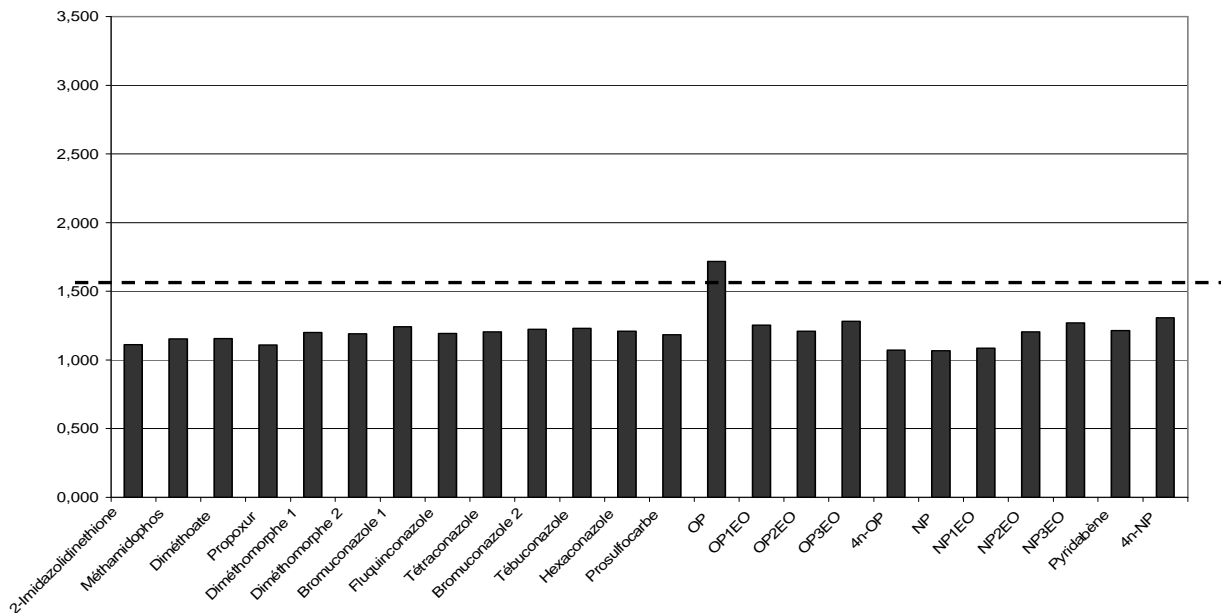


Figure 3-15 : Rapports des aires obtenues lors de l'évaporation d'un extrait blanc dopé en fonction de la masse finale recherchée, résultats pour une masse finale de 1,5 g et 1 g, droite en pointillés représente le seuil théorique situé à 1,56

Dans cette série d'expériences, on constate l'apparition d'un effet négatif surtout lorsque l'on compare un volume final de 1,5 et de 0,5 mL (annexe XV). L'effet est similaire quel que soit le composé, nous n'observons pas de dispersion des valeurs.

Extraits blanc dopés différemment après évaporation

Pour s'affranchir d'un possible effet de l'évaporation, nous avons procédé au même dopage que précédemment à la différence que les dopants sont ajoutés après évaporation. Les valeurs des masses expérimentales sont 0,5162 , 1,0058 et 1,5056 g.

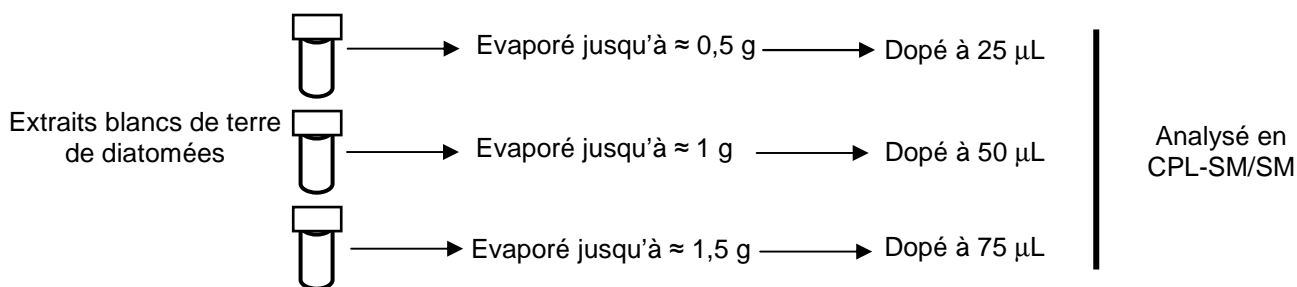


Figure 3-16 : Schéma de l'expérience avec extrait blanc évaporé puis dopé en quantité différente

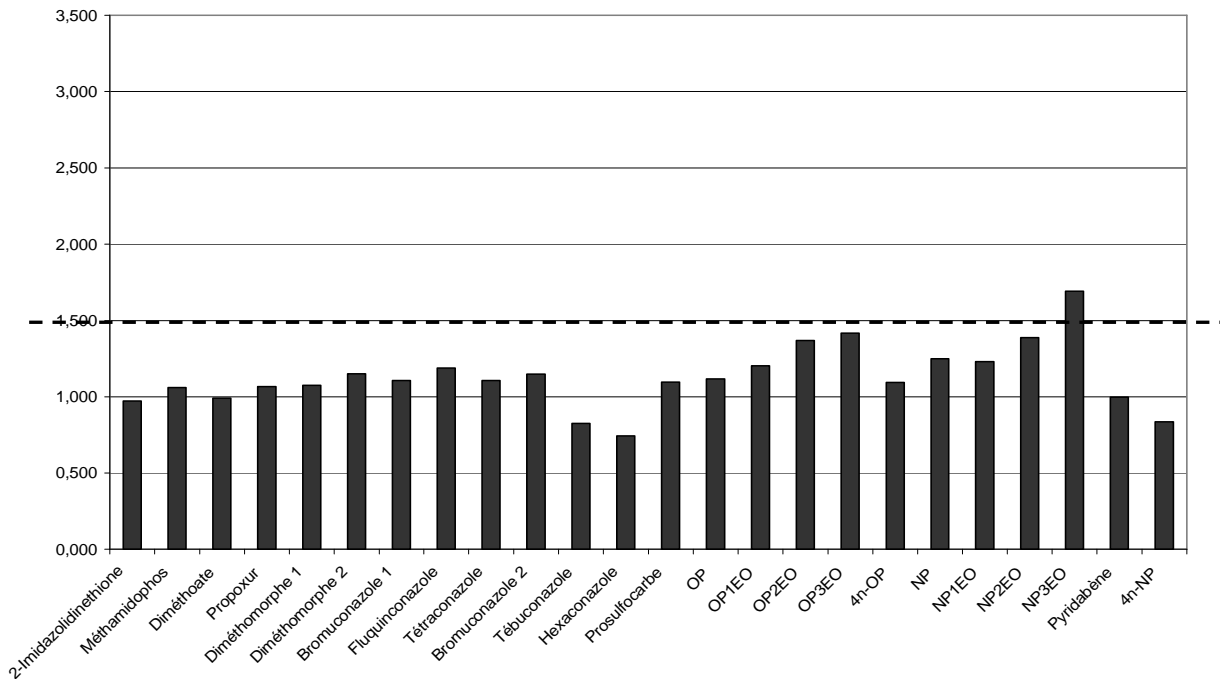


Figure 3-17 : Rapports des aires obtenues lors de l'évaporation d'un extrait blanc dopé en fonction de la masse finale recherchées, résultats pour une masse finale de 1,5 g et 1 g, droite en pointillés représente le seuil théorique situé à 1,50

Les résultats obtenus par comparaison d'une masse finale de 1,5 g et 1 g sont proches de ceux trouvés pour un dopage avant évaporation avec une dispersion faible. Cependant, les résultats présentés sur les graphes en annexe XV affichent des variations conséquentes sur les ratios des aires mesurées autant pour un rapport de 1,5g/0,5g que pour un rapport de 1/0,5g. Il est difficile de proposer une explication à ces observations, des répétitions de ces expériences permettront peut être de mieux appréhender et de dégager une hypothèse sur ce phénomène.

Extraits de boue dopés en quantité équivalente

Suite aux résultats obtenus pour un dopage avant évaporation, nous avons étudié les mêmes conditions en présence de matrice. L'expérience est résumée sur la figure 3-18. Dans le cas d'un dopage identique de 50 µL quel que soit le volume final d'évaporation (0,5486 , 1,0013 et 1,4503 g), nous avons calculé les rapports qui sont présentés sur le figure 3-19.

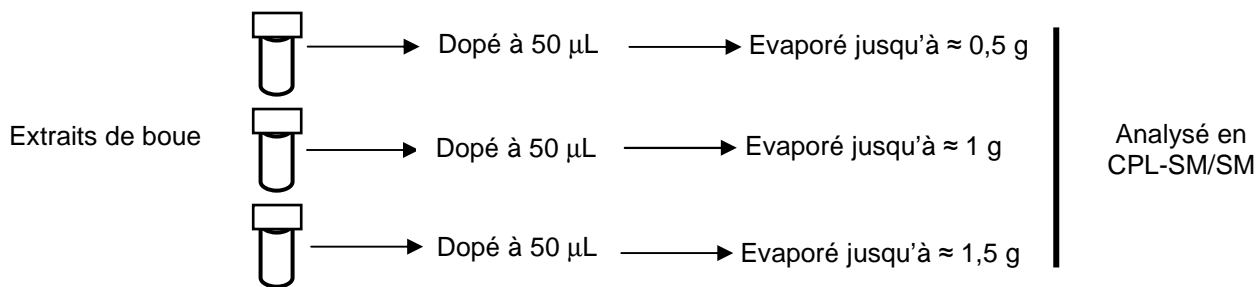


Figure 3-18 : Schéma de l'expérience avec un extrait de boue dopé en quantité identique avant évaporation

III.2 Optimisation de l'extraction des substances à partir des matrices solides et étude de la purification de l'extrait obtenu

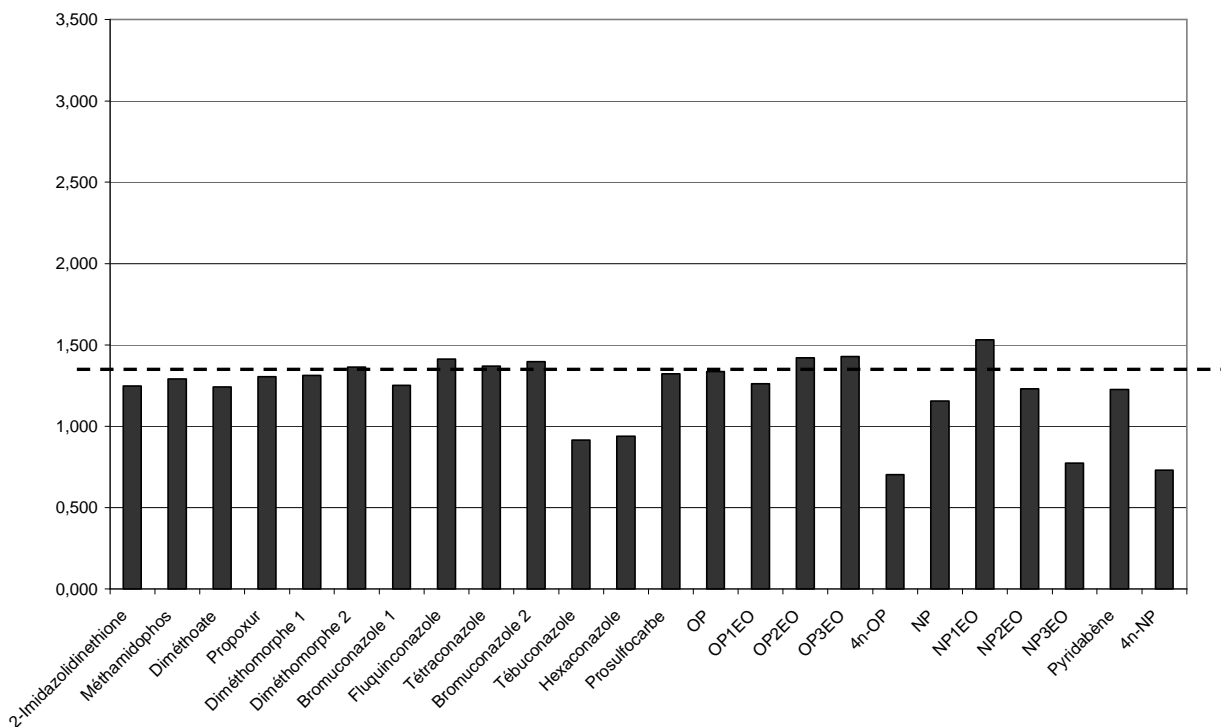


Figure 3-19 : Rapports des aires obtenus lors de l'évaporation d'un extrait de boue dopé identiquement pour une masse finale de 1,5 g et 1 g, droite en pointillés représente le seuil théorique situé à 1,45

On constate ici une stabilité des rapports sur les organophosphorés, les carbamate et quelques fongicides mais aussi une disparité beaucoup plus importante sur les autres composés. Cette observation est remarquable surtout lorsque l'on compare une concentration à 1,5/0,5g et à 1/0,5 g (annexe XV). Ceci traduit un effet combiné de la matrice et de la concentration des analytes de plus en plus fort jusqu'à un maximum à 0,5 g.

Extraits de boue dopés différemment

Nous avons mené la même série d'expériences en présence de matrice avec un dopage différent suivant le volume final de concentration recherché (0,5314 , 1,0173 et 1,4291 g). Les rapports des aires sont rapportés sur la figure 3-21.

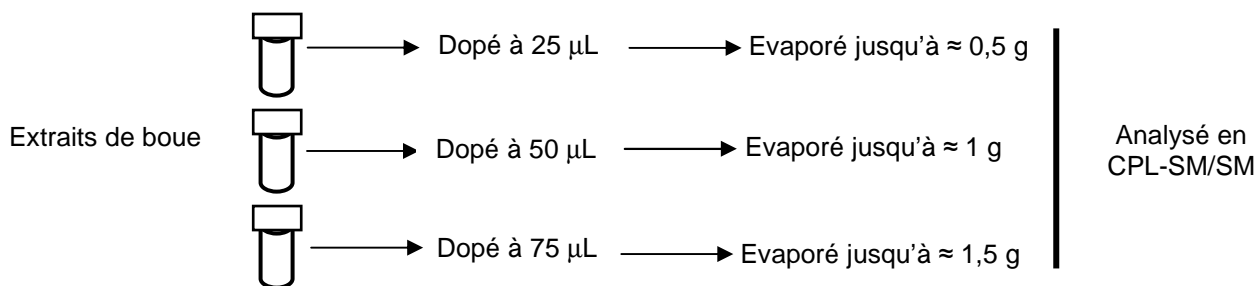


Figure 3-20 : Schéma de l'expérience réalisée avec un extrait de boue dopé en quantité différente avant évaporation

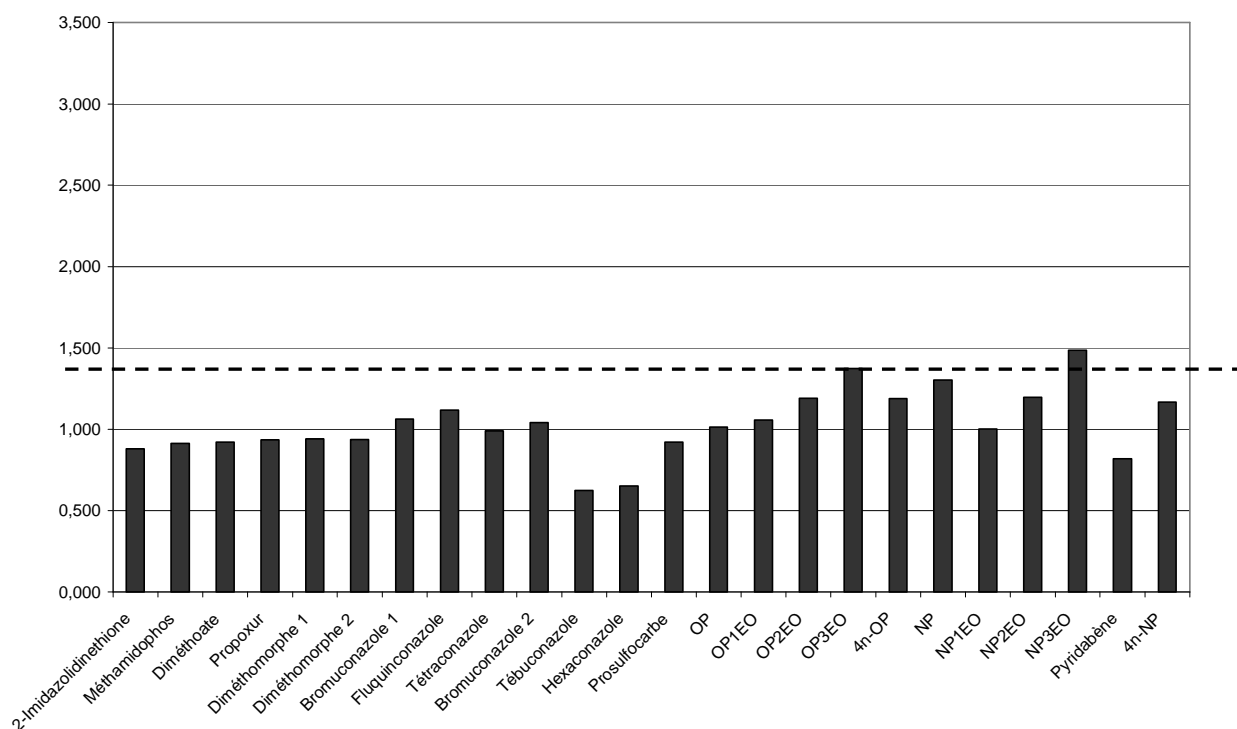


Figure 3-21 : Rapports des aires obtenues lors de l'évaporation d'un extrait blanc dopé en fonction de la masse finale recherchée, résultats pour une masse finale de 1,5 g et 1 g, droite en pointillés représente le seuil théorique situé à 1,40

Dans cette série d'expériences, les rapports des aires sont stables pour une comparaison de 1,5/1 g mais des écarts plus forts sont observés pour les deux autres ratios. Notamment, la plus forte variation est remarquée pour un rapport des aires obtenues sur 1,5 et 0,5 g. Les rapports des aires mesurées sont loin de la valeur seuil pour une majorité de composés, excepté pour le NP₁EO, le tébuconazole et l'hexaconazole, les OPnEOs et les NP₂EO sont négativement affectés par ces conditions expérimentales.

Pour compléter cette étude il serait intéressant d'évaluer précisément l'effet de matrice pour chaque masse de concentration, ce que l'on peut illustrer par la comparaison de l'aire obtenue pour chaque molécule dans la situation d'un dopage adapté à la masse finale recherchée. Le graphe 3-22 présente ces résultats, en noir une concentration dans 0,5 g, en blanc une concentration dans 1 g et en gris dans 1,5 g. Toutes les aires ont été corrigées selon les valeurs expérimentales exactes des masses par rapport au dopage à 50 μ L.

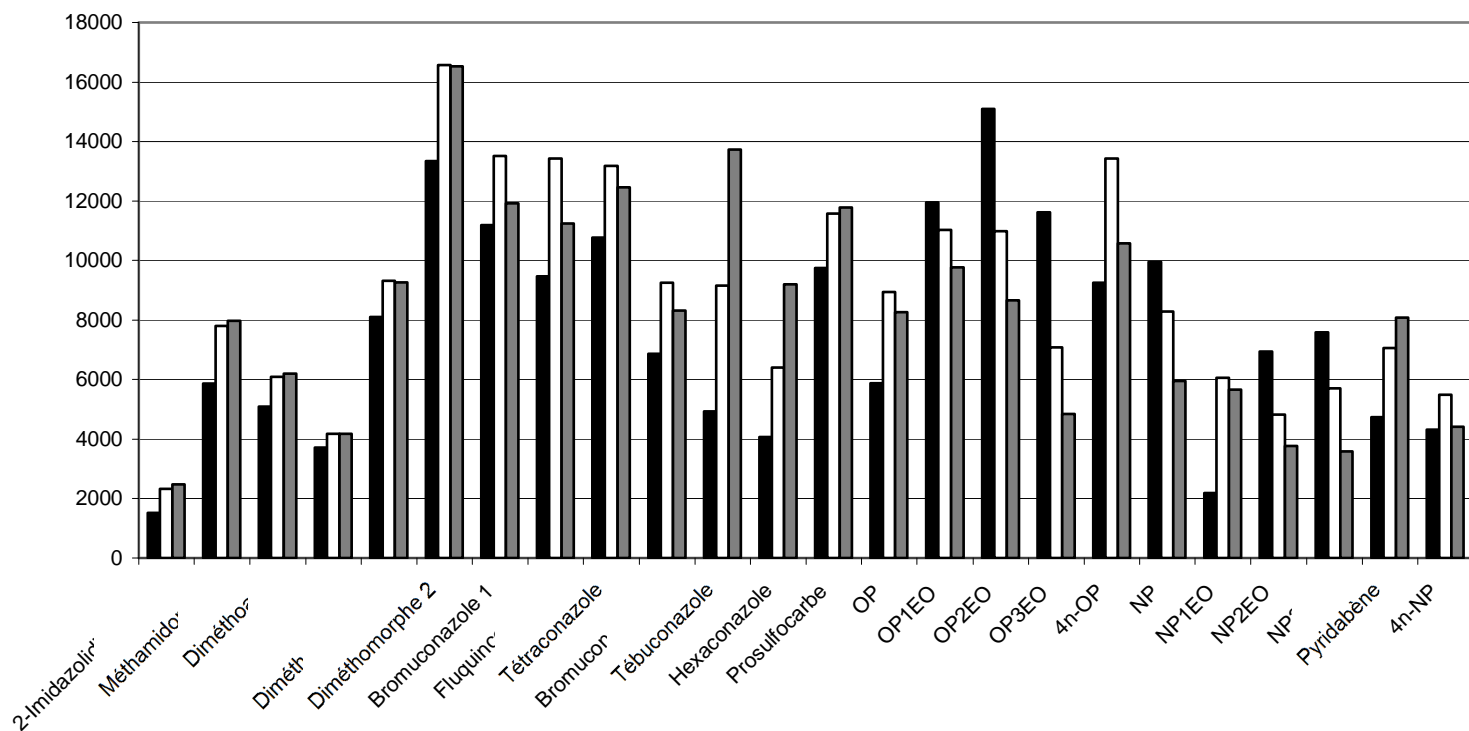


Figure 3-22 : Aires mesurées pour chaque analyte en fonction de leur concentration dans 0,5 (noir), 1 (blanc) et 1,5 g (gris) d'extrait

Cette étude nous a permis de mettre en évidence un effet de l'évaporation lorsque l'on tente de concentrer l'extrait PLE. Cet effet engendre une concentration des analytes recherchés mais celle des interférents en même temps. A la vue de ces résultats, un compromis acceptable sera de concentrer nos molécules d'intérêt dans 1 g d'extrait.

III.3 Application de la méthode à l'analyse de 22 substances à partir des matrices solides - Résultats

1. Méthode d'analyse

Pour évaluer l'optimisation de l'extraction, de la méthode de purification et l'impact du volume d'extrait, nous avons appliqué la méthode d'analyse optimisée pour les 22 composés extraits à partir des échantillons aqueux. L'analyse des 11 autres composés dans les extraits de boue par CPG-SM n'est pas possible compte tenu de la charge organique encore présente dans l'échantillon.

En suivant la même procédure que celle détaillée sur la figure 2-1, nous avons évalué l'effet matrice de la même manière que celle décrite dans le chapitre II, partie 3, paragraphe 2.1. puis évalué les limites de détection et de quantification.

1.1. Effet de matrice

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre II, nous avons évalué de la même manière l'effet de matrice sur un extrait dopé et un extrait non dopé par rapport à un étalon à la même concentration en analytes (≈ 5 ppm). Ceci nous permet de calculer un pourcentage suivant l'équation 2-4, repris par :

$$\text{Suppression/augmentation de signal} = \left[\frac{(A_s - A_x)}{A_d} \right]$$

A_s : extrait dopé
A_x : extrait non dopé
A_d : étalon de même concentration

Équation 3-2 : Equation du calcul de l'effet de matrice [35]

Les valeurs de chacun des composés sont regroupées par famille sur le graphe 3-18.

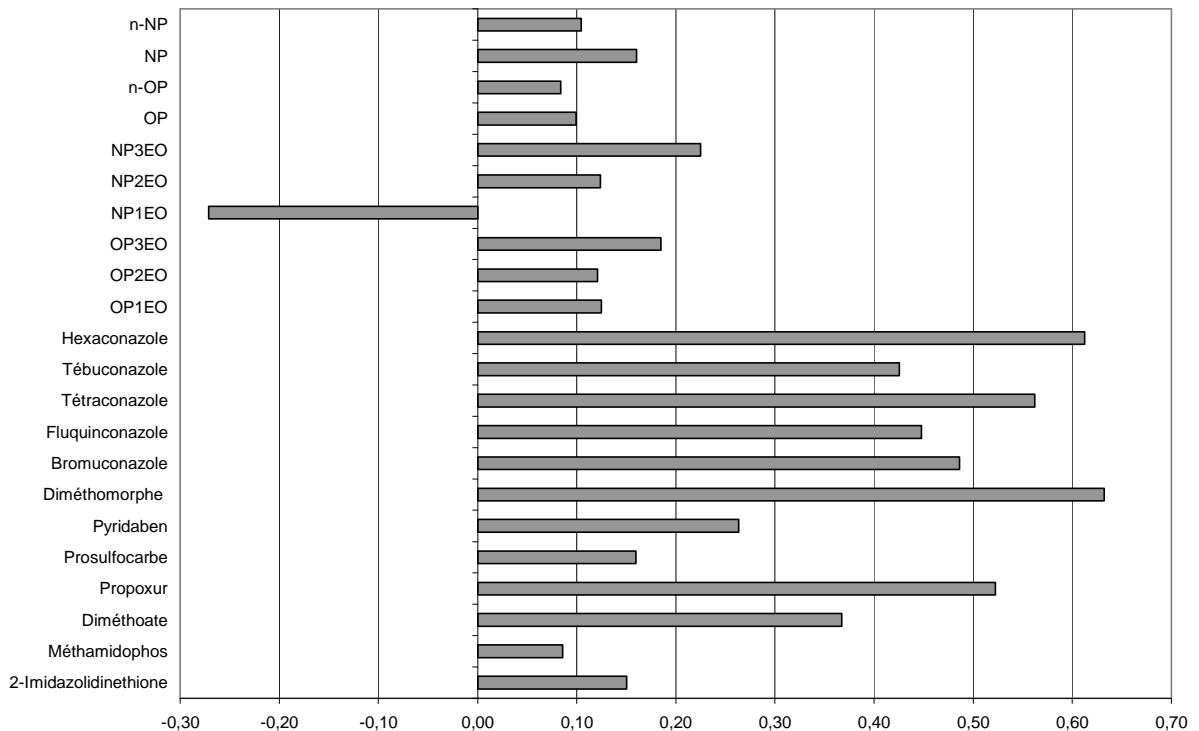


Figure 3-23 : Effet de matrice évalué sur un extrait de boue de STEP

On remarque un fort effet de matrice, sous la forme de suppression d'ion car le coefficient est inférieur à 1. Les composés les plus affectés sont les APs et APnEOs avec les organophosphorés. L'explication de ce phénomène serait la baisse de l'efficacité d'ionisation de la source électrospray et de la transmission des ions en spectrométrie de masse à cause des interférents.

1.2. Linéarité - Limites de détection et de quantification

Nous avons réalisé des extractions de boues suivant les conditions PLE optimisées que nous avons dopé à 6 niveaux différents avant injection en CPL-SM/SM et de manière à déterminer la linéarité des droites d'étalonnage. Pour chacun des composés nous avons obtenus des coefficients de régression supérieurs à 0,99.

Pour procéder à l'évaluation des limites de détection et de quantification nous avons appliqué les équations 3-3 à partir de la construction des droites de régression de l'étalonnage.

$$LD = \frac{3 \times s(b)}{a} \quad s(b) : \text{écart type de l'ordonnées à l'origine de la droite de régression}$$

$$LQ = \frac{10 \times s(b)}{a} \quad a : \text{pente de la droite de régression}$$

Équation 3-3 : Estimation des limites de détection (LD) et de quantification (LQ)

Puis nous avons appliqué les formules statistiques de limites données dans la partie II (équations 2-5). Les résultats sont présentés en annexe XVI. On peut ainsi vérifier les critères de validation qui permettent de fixer les limites de détection et de quantification pour les boues et pour les matrices moins chargées qui sont concentrées à partir de 5 g d'échantillon dans 200 µL (tableau 3-7).

Composés	Boues de STEP			Sédiments/Retombées atmosphériques/dépôts
	Limite de détection estimée (ppb)	Limite de quantification estimée (ppb)	Limite de quantification validée (ppb)	Limite de détection estimée (ppb)
NP	1680 ± 80	5610 ± 280	4940 ± 250	67 ± 3
4nNP	6,0 ± 0,3	17,0 ± 0,9	58 ± 3	0,24 ± 0,01
NP ₁ EO	5,2 ± 0,3	21,1 ±	21 ± 1	0,20 ± 0,01
NP ₂ EO	21 ± 1	70 ± 4	79 ± 4	0,84 ± 0,04
OP	1326 ± 66	4430 ± 220	4750 ± 240	53 ± 3
4-nOP	10,2 ± 0,5	34 ± 2	68 ± 3	0,40 ± 0,02
OP ₁ EO	7,1 ± 0,4	24 ± 1	46 ± 2	0,28 ± 0,01
OP ₂ EO	11,2 ± 0,6	37 ± 2	15,2 ± 0,8	0,44 ± 0,02
Diméthoate	9,3 ± 0,5	31 ± 2	24 ± 1	0,360 ± 0,02
Méthamidophos	17,1 ± 0,9	56 ± 3	54 ± 3	0,680 ± 0,03
2-Imidazolidinethione	634 ± 32	2110 ± 110	1329 ± 66	25 ± 1
Propoxur	10,3 ± 0,5	34 ± 2	30 ± 2	0,40 ± 0,02
Tébuconazole	6,1 ± 0,3	20 ± 1	15,6 ± 0,8	0,24 ± 0,01
Hexaconazole	6,4 ± 0,3	21 ± 1	18,0 ± 0,9	0,24 ± 0,01
Tétraconazole	16,1 ± 0,8	52 ± 3	47 ± 2	0,64 ± 0,03
Fluquiconazole	14,5 ± 0,7	46 ± 2	29 ± 1	0,56 ± 0,03
Bromuconazole	13,4 ± 0,7	42 ± 2	30 ± 2	0,52 ± 0,03
Prosulfocarbe	5,2 ± 0,3	17,4 ± 0,9	19 ± 1	0,200 ± 0,004
Diméthomorphe	12,6 ± 0,6	39 ± 2	31 ± 2	0,48 ± 0,02
Pyridabène	7,7 ± 0,4	24 ± 1	31 ± 2	0,28 ± 0,01

Tableau 3-7 : Limites de détection et de quantification estimées et validée des 22 composés dans les boues de STEP

Ces limites de détection sont comprises entre 5 ng.g⁻¹ et 1,7 µg.g⁻¹ dans les boues et 0,2 à 68 ng.g⁻¹. Les limites de quantification permettent d'atteindre des valeurs de l'ordre du µg.kg⁻¹ pour la plupart des composés répondant aux futures exigences réglementaires et environnementales.

2. Echantillons évalués

Après avoir mis au point et optimisé la méthode d'analyse des 22 composés à partir des boues de STEP, nous avons analysés des échantillons réels, tels que des matières en suspension de rivière (Rhône, France), des retombées atmosphériques et des dépôts de toiture. Ces échantillons ont tous été lyophilisés et tamisés à 220 μm . Les matières en suspension, les retombées atmosphériques et les dépôts de toiture présentent une teneur en matière organique beaucoup plus faible ($\%C+\%H+\%N+\%O+\%S < 25 \%$), nous avons pu concentrer à 200 μL chacune de ses matrices extraites à partir de 5 g. Les boues de STEP sont quant à elles concentrées à 1 g comme nous l'avons étudié auparavant.

2.1.1. Boues de STEP

Les boues de STEP ont été prélevées au mois de mars 2007, broyées, lyophilisées puis tamisées à 220 μm . L'échantillon a été tamisé et conservé à -20°C pour être ensuite extrait selon le protocole optimisé. La masse extraite est de 1,5 g de boue sèche. Suite à la purification, l'extrait est concentré à 1 mL puis injecté en CPL-SM/SM. Les composés sont quantifiés par la méthode des ajouts dosés. Les ajouts sont réalisés avant extraction par PLE.

2.1.2. Matières en suspension

Cet échantillon a été collecté le 03 juin 2008, il représente précisément la matière en suspension du fleuve prélevée lors du pompage d'eau du fleuve à 7 m de la berge et à 1 m de profondeur, au niveau de Ternay (Rhône, France).

L'échantillon mis à disposition était en faible quantité. Il a été extrait selon le protocole PLE optimisé sur les boues. La charge organique de cette matrice est beaucoup plus faible que celle des boues, nous avons donc quantifié les 22 polluants à partir de 4 g d'échantillon sec et réalisé une quantification par étalonnage externe.

2.1.3. Retombées atmosphériques

Les retombées atmosphériques ont été prélevées à proximité de Chassieu (Rhône, France) sur une durée de 4 mois. Le prélèvement a été effectué le 03 avril 2008. La collecte est réalisée par dépôt naturel des poussières en suspension dans l'air retombant dans des bacs de grandes dimensions.

2.1.4. Dépôts de toiture

La méthode mise en place a été évaluée sur un type de matrice beaucoup moins étudié que les boues de STEP ou les sols ou les sédiments, les dépôts de toiture. Nous avons effectué quatre prélèvements sur le toit du laboratoire en différents points. Ces solides proviennent des poussières atmosphériques véhiculées par les pluies et les vents issues du dépôt lent. Il est à noter qu'une certaine activité bactérienne entretenue par l'apport d'eau sous forme de pluie peut avoir lieu.

3. Résultats

Le tableau des résultats rapportant les composés détectés et/ou quantifiés figure en annexe XVII, et ci dessous sur la figure 3-19. Les concentrations mesurées sont rapportées à la masse d'échantillon sec. Les APs linéaires, 4n-NP et 4n-OP n'ont jamais été détectés dans ces échantillons.

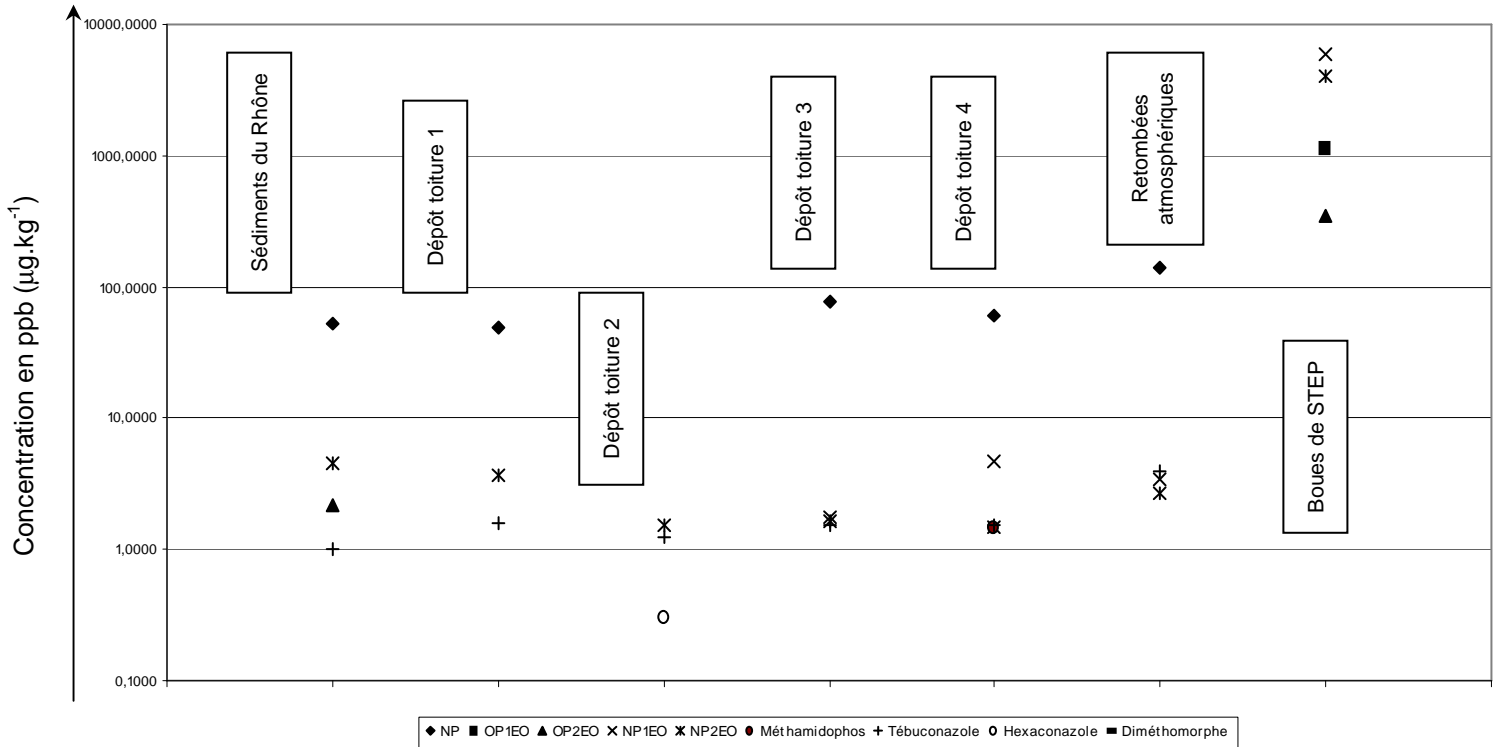


Figure 3-24 : Résultats en ppb ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) sur les échantillons solides analysés par la méthode mise au point en CPL-SM/SM

On constate la présence d'APnEOs dans la plupart des échantillons analysés, avec des ultra-traces de fongicides et certains pesticides. Les NP_{2,3}EOs sont détectés dans tous les échantillons, le NP₂EO est quantifié dans tous les échantillons. Le tébuconazole est quantifié dans toutes les matrices solides analysées excepté dans les boues. Cet échantillon est celui qui contient de fortes teneurs d'APnEOs avec un maximum pour le NP₁EO. Les fongicides détectés dans les dépôts de toiture peuvent avoir comme origine le traitement du revêtement bitumeux prétraité sur lequel nous avons effectué le prélèvement. Pour confirmer leur présence il faudrait pouvoir analyser une surface de ce même revêtement.

L'échantillon des matières en suspension du Rhône est celui dans lequel nous avons révélé la présence du plus grand nombre de composés, 11 sur 22.

3.1. Boues de STEP

Les boues de STEP comportent une proportion forte de NPnEOs et OpnEOs, la teneur totale relevée est de 13,2 ppm ($\mu\text{g.g}^{-1}$). Les NP_{1,2}EOs sont les formes éthoxylates majoritaires. Aucun pesticide recherché n'est détecté, même pour les pesticides dont les substances actives sont utilisées dans des formulations domestiques.

3.2. *Matières en suspension*

Cet échantillon représente la seconde matrice la plus polluée après les boues de STEP mais pas en terme de quantité. En effet c'est dans cet échantillon qu'une majorité de composés sont détectés, 3 pesticides (tébuconazole, diméthomorphe et pyridabène) et les 8 alkylphénols recherchés. Les concentrations mesurées restent inférieures à 5 ppb ($\mu\text{g.kg}^{-1}$), sauf pour les NPs dont le seuil est de 52 ppb.

3.3. *Retombées atmosphériques*

Les retombées atmosphériques analysées sont collectées à la fois à proximité de zone agricole mais aussi de zones industrielles. Les composés détectés sont 2 pesticides, le diméthoate et le tébuconazole à 3,9 ppb et 6 alkylphénols (4 éthoxylates et les NPs et OP). C'est d'ailleurs dans cette matrice que l'on relève la plus forte concentration en tébuconazole et en NP (141 ppb).

3.3. *Dépôts de toiture*

L'analyse de cette matrice nous a permis de mettre en évidence une majorité de composés déjà notés dans les retombées atmosphériques, tels que les APs et APnEOs et certains pesticides. Une faible disparité existe entre chaque zone de prélèvements. Le dépôt 1 est celui qui semble être le moins contaminé, le dépôt 2 le plus. La teneur la plus forte est de 77 ppb en NPs.

Conclusions – Objectifs atteints

La mise au point d'une méthode d'analyse de contaminants multi-familles à partir de matrices solides environnementales nécessite l'optimisation de deux étapes primordiales. D'une part, l'efficacité d'une méthode d'extraction sélective doit être évaluée à travers les paramètres de la technique et d'autre part, surtout lorsqu'il s'agit d'une matrice fortement organique telle que les boues de STEP, il est obligatoire de mettre en place une procédure de purification efficace.

Nous avons réalisé ces études en optimisant l'extraction à partir de boues de STEP de 22 composés (10 alkylphénols et 12 pesticides) par étude statistique des paramètres de l'ASE 200 (PLE). Puis nous avons évalué différentes techniques de purification, celle que nous avons retenue repose sur une SPE en phase normale telle que nous l'avons développée pour les extraits aqueux. Suite à cela, une série d'expériences nous a permis d'observer un effet de matrice lié à la concentration des extraits de boues de STEP lors de l'étape de l'évaporation. Nous avons constaté qu'il n'est pas nécessaire de concentrer dans un volume minimal qui concentre également les interférents. Il est plus judicieux d'atteindre une masse d'extrait de 1 g environ qui permet d'obtenir de meilleures sensibilités sur une majorité de composés.

Nous avons ainsi validé les limites de détection et de quantification de la méthode mise au point, nous permettant d'atteindre des valeurs de l'ordre de la quinzaine de $\mu\text{g.kg}^{-1}$. L'application de cette méthode à des échantillons réels nous a permis de quantifier les APs et certains pesticides dans des matrices aussi variées que des boues de STEP, des matières en suspension de rivières, des retombées atmosphériques et des dépôts de toiture.

De manière synoptique, la méthode ainsi mise au point revient à analyser l'échantillon solide selon le schéma suivant :

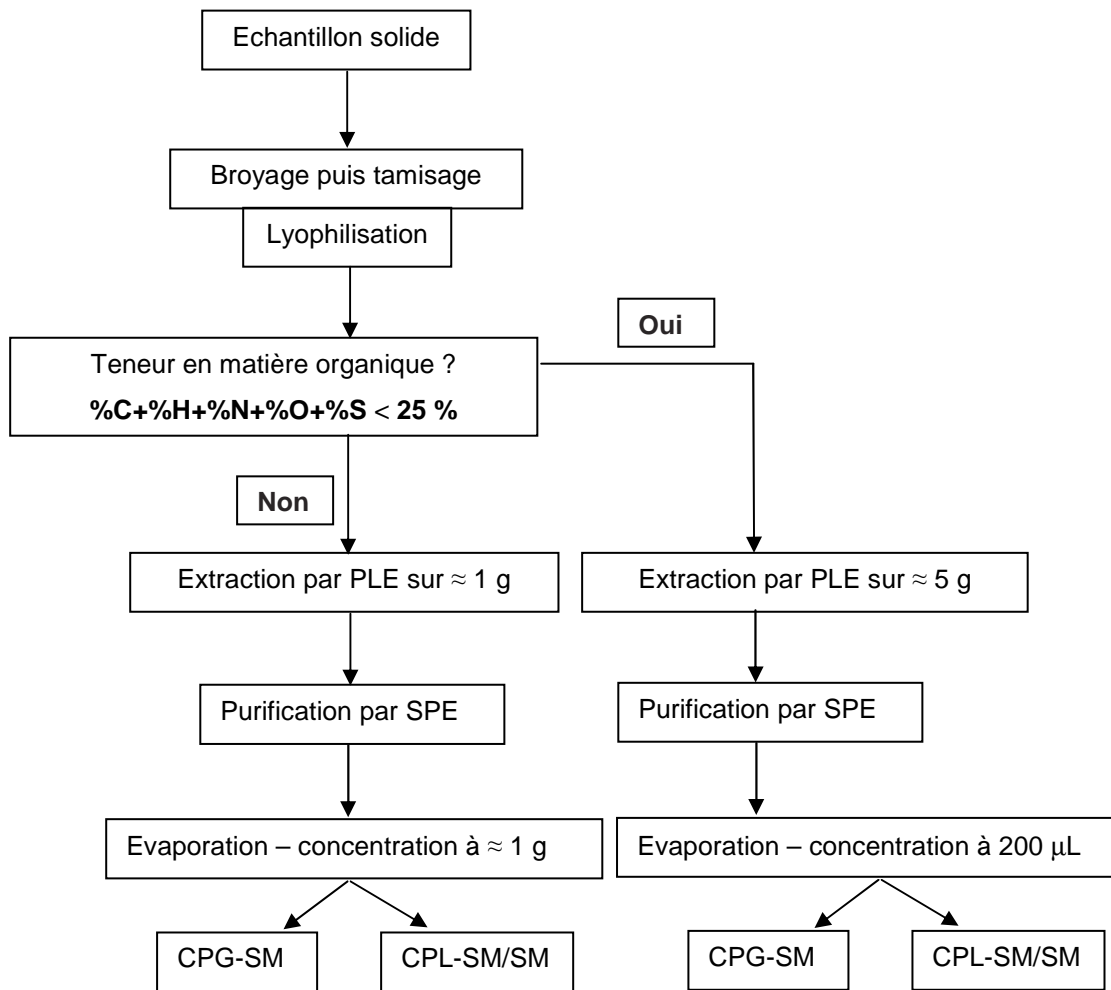


Figure 3-25 : Schéma synoptique du protocole analytique mis en place pour les matrices solides

Références bibliographiques du chapitre III

1. Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie, A. Les boues d'épuration municipales et leur utilisation en agriculture - dossier documentaire. 2001. Disponible à partir de <http://www.ademe.fr/partenaires/Boues/Pages/plan.htm>
2. Peng, X., Yu, Y., Tanga, C., Tana, J., Huang, Q. & Wang, Z. (2008). Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China. *Science of the Total Environment*, 397, 158-166
3. Dvorska, A., Lammel, G., Klanova, J. & Holoubek, I. (2008). Kosetice, Czech Republic - ten years of air pollution monitoring and four years of evaluating the origin of persistent pollutants. *Environmental Pollution, En cours*,
4. Ghanem, A., Bados, P., Estaun, A. R., de Alencastro, L. F., Taibi, S., Einhorn, J. & Mougin, C. (2007). Concentrations and specific loads of glyphosate, diuron, atrazine, nonylphenol and metabolites thereof in French urban sewage sludge. *Chemosphere*, 69, 1368-1373
5. Granier, L. K. & Chevreuil, M. (1997). Behaviour and spatial and temporal variations of polychlorinated biphenyls and lindane in the urban atmosphere of the Paris area, France. *Atmospheric Environment*, 31, 3787-3802
6. Dionex S.A. Methods Optimization in Accelerated Solvent Extraction (ASE®). 2004. Disponible à partir de http://www.dionex.com/en-us/webdocs/4736_TN208.pdf
7. Richter, B., Jones, B., Azzell, J. & Porter, N. (1996). Accelerated Solvent Extraction : a technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, 68, 1033-1039
8. Miège, C., Dugay, J. & Hennion, M. C. (2003). Optimization, validation and comparison of various extraction techniques for the trace determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludges by liquid chromatography coupled to diode-array and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 995, 87-97
9. Gibson, R., Wang, M.-J., Padgett, E. & Beck, A. (2005). Analysis of 4-nonylphenols, phthalates, and polychlorinated biphenyls in soils and biosolids. *Chemosphere*, 61, 1336-1344
10. Hildebrandt, A., Lacorte, S. & Barcelo, D. (2007). Assessment of priority pesticides, degradation products, and pesticides adjuvants in groundwaters and top soils from agricultural areas of the Ebro river basin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 1459-1468
11. Villar, P., Callejon, M., Alonso, E., Jimenez, J. C. & Guiraum, A. (2004). Optimization and validation of analysis for polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge by liquid chromatography after microwave assisted extraction. *Analytica chimica acta*, 524, 295-304
12. Doong, R.-A. & Liao, P.-L. (2001). Determination of organochlorine pesticides and their metabolites in soil samples using headspace solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, 918, 177-188
13. Ternes, T., Bonerz, M., Herrmann, N., Löffler, D., Keller, E., Lacida, B. B. & Alder, A. C. (2005). Determination of pharmaceuticals, iodinated contrast media and musk fragrances in sludge by LC/tandem MS and GC/MS. *Journal of Chromatography A*, 1067, 213-223
14. Gomes, R. L., Avcioglu, E., D, S. M. & Lester, J. N. (2004). Steroid estrogen determination in sediment and sewage sludge : a critique of sample preparation and chromatographic/mass

- spectrometry considerations, incorporating a case study in method development. *Trends in analytical chemistry*, 23, 737-744
15. Lide, D. R. (2006-2007). *Handbook of chemistry and physics* 87th Edition.
 16. British Crop Protection Council (2003). *The Pesticide Manual* (Thirteenth Edition). Alton, BCPC.
 17. Petrovic, M., Lacorte, S., Viana, P. & Damia, B. (2002). Pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of alkylphenolic compounds in river sediment. *Journal of Chromatography A*, 959, 15-23
 18. Andreu, V., Ferrer, E., Rubio, J. L., Font, G. & Pico, Y. (2007). Quantitative determination of octylphenol, nonylphenol, alkylphenol ethoxylates and alcohol ethoxylates by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-mass spectrometry in soils treated with sewage sludges. *Science of the Total Environment*, 378, 124-129
 19. Concha-Grana, E., Turnes-Carou, M. L., Muniategui-Lorenzo, S., Lopez-Mahia, P., Fernandez-Fernandez, E. & Prada-Rodriguez, D. (2004). Development of pressurized liquid extraction and cleanup procedures for determination of organochlorine pesticides in soils. *Journal of Chromatography A*, 1047, 147-155
 20. Dabrowskia, L., Giergielewicz-Mozajskab, H., Biziukb, M., Gacaa, J. & Namiesnik, J. (2002). Some aspects of the analysis of environmental pollutants in sediments using pressurized liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 957, 59-67
 21. Villaverdea, J., Hildebrandtb, A., Martínezb, E., Lacorteb, S., Morilloa, E., Maquedaa, C., Vianac, P. & Barceló, D. (2008). Priority pesticides and their degradation products in river sediments from Portugal. *Science of the Total Environment*, 390, 507-513
 22. Lara-Martín, P. A., Gomez-Parra, A. & Gonzalez-Mazo, E. (2006). Development of a method for the simultaneous analysis of anionic and non-ionic surfactants and their carboxylated metabolites in environmental samples by mixed-mode liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1137, 188-197
 23. Céspedes, R., Lacorte, S., Ginebreda, A. & Damia, B. (2008). Occurrence and fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates in sewage treatment plants and impact on receiving waters along the Ter River (Catalonia, NE Spain). *Environmental Pollution*, 153, 384-392
 24. Hussen, A., Westbom, R., Megersa, N., Mathiasson, L. & Björklund, E. (2007). Selective pressurized liquid extraction for multi-residue analysis of organochlorine pesticides in soil. *Journal of Chromatography A*, 1152, 247-253
 25. Fitzpatricka, L. J., Deana, J. R., Comberb, M. H. I., Harradinec, K. & Evans, d. K. P. (2000). Extraction of DDT [1,1,1,-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane] and its metabolites DDE [1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)-ethylene] and DDD [1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)-ethane] from aged contaminated soil. *Journal of Chromatography A*, 874, 257-264
 26. Box, G. E. P., Hunter, J. S. & Hunter, W. G. (2005). *Statistics for experimenters, Design, Discovery and Innovation* NewYork, Wiley, J.
 27. Datta, S., Loyo-Rosales, J. E. & Rice, C. P. (2002). A Simple Method for the Determination of Trace Levels of Alkylphenolic Compounds in Fish Tissue Using Pressurized Fluid Extraction, Solid Phase Cleanup, and High-Performance Liquid Chromatography Fluorescence Detection *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 1350-1354

28. Saito, K., Sjödin, A., Sandau, C. D., Davis, M., Nakazawa, H., Matsuki, Y. & Patterson Jr., D. G. (2004). Development of a accelerated solvent extraction and gel permeation chromatography analytical method for measuring persistent organohalogen compounds in adipose and organ tissue analysis. *Chemosphere*, 57, 373-381
29. Bester, K. & Hühnerfuss, H. (1997). Improvements of a combined size exclusion chromatography and solid phase extraction approach for the clean-up of marine sediment samples for trace analysis of pesticides. *Frenesius Journal of Analytical Chemistry*, 358, 630-634
30. Environmental Protection Agency (EPA). (1994). Method 3640A : Gel Permeation Cleau-up.
31. Lega, R., Ladwig, G., Meresz, O., Clement, R. E., Crawford, G., Salemi, R. & Jones, Y. (1997). Quantitative determination of organic priority pollutants in sewage sludge by GC/MS. *Chemosphere*, 34, 1705-1712
32. Kipton, H., Powell, J. & Town, R. M. (1992). Solubility and fractionation of humic acid ; effect of pH and ionic medium. *Analytica chimica acta*, 267, 47-54
33. Gatidou, G., Thomaidis, N., Stasinakis, A. & Lekkas, T. (2007). Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1138, 32-41
34. Petrovic, M., Diaz, A., Ventura, F. & Barcelo, D. (2001). Simultaneous determination of halogenated derivatives of alkylphenol ethoxylates and their metabolites in sludges, river sediments, and surface, drinking and wastewaters by liquid chromatography-mass spectrometry *Analytical Chemistry*, 73, 5886-5895
35. Hernando, M. D., Heath, E., Petrovic, M. & Barcelo, D. (2006). Trace-level determination of pharmaceutical residues by LC-MS/MS in natural and treated waters; A pilot-survey study. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385, 985-991

Conclusion générale

Conclusion

Le projet de thèse mis en place dès 2005, avait pour objectif de mettre au point une méthode d'analyse d'ultra-traces et traces de polluants prioritaires sujets au règlement REACH et susceptibles d'être présents dans l'environnement.

Les travaux réalisés sont basés sur les matrices aqueuses et les matrices solides, et plus particulièrement dans un premier temps sur les effluents de STEP et les boues de STEP. L'optimisation ainsi mise au point sur des échantillons chargés en matière organique, nous a permis de l'appliquer à des matrices moins chargées telles que les eaux de surface, les eaux souterraines ou les eaux potables et aux sédiments, retombées atmosphériques ou dépôts de toiture.

Face au grand nombre de substances chimiques produites et utilisées dans le monde, certaines sont employées dans de nombreux domaines et le règlement REACH ne dresse aucune liste précise des composés qui seront interdits. Nous avons donc procédé à une sélection des polluants prioritaires qu'il est judicieux de rechercher dans l'environnement Rhône-Alpin. D'après l'étude bibliographique que nous avons menée, nous avons choisi les alkylphénols et leurs formes éthoxylates avec une chaîne alkyle composée de 8 (octyl) et 9 (nonyl) atomes de carbone, tout comme le bisphénol A et deux phtalates (diéthylhexylphtalate et le dibutylphtalate), pour leur large emploi à travers différentes formulations de produits manufacturés aussi bien domestiques qu'industrielles. Ces composés représentent des perturbateurs endocriniens dits industriels. A cette liste de substances, nous avons ajouté des pesticides en tenant compte de la forte activité agricole de la région Rhône-Alpes. Ces pesticides ont été choisis dès 2005 et la plupart d'entre eux ont été interdits (pesticides organochlorés) ou été en cours d'interdiction dans le courant de l'année 2007 ou 2008 (méthamidophos, prosulfocarbe, tébuconazole, hexaconazole, tétraconazole, fluquinconazole, diméthormorhe, pyridabène). Nous avons aboutis à une liste de 33 substances réglementées et jouant un rôle de polluants prioritaires de l'environnement.

Les premiers travaux ont été réalisés sur les matrices aqueuses. L'optimisation de la préparation d'échantillon et de l'extraction des 33 substances exécutées sur des effluents de STEP a permis d'élaborer un protocole de préparation d'échantillon robuste et fiable grâce à la filtration et à l'acidification de l'échantillon et une étape de concentration des analytes par SPE en phase inverse sur phase C-18. L'étape de préparation d'échantillon a été rigoureusement évaluée afin de quantifier la perte ou la pollution de l'échantillon au cours de cette exécution. Ensuite, les différents paramètres de l'étape de concentration par SPE ont été optimisés (débit, vitesse de charge, volume chargé sur la cartouche, solvant d'élution) aboutissant à la collecte des molécules recherchées dans deux fractions. Face à un échantillon contenant de nombreuses molécules interférantes nous avons développé une méthode de purification de l'extrait par SPE sur silice en phase normale. Ce protocole global nous permet de concentrer nos analytes dans 200 μ L obtenant ainsi un facteur de concentration de 1500 fois.

En parallèle de ces évaluations, nous avons optimisé une méthode d'analyse. D'après l'étude bibliographique, les techniques chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse sont des techniques analytiques de choix pour l'analyse des polluants dans l'environnement. Nos molécules

Conclusion

ayant des caractéristiques et des propriétés physico-chimiques bien distinctes, nous avons comparé leur comportement et leur sensibilité sur deux appareillages, la CPG-SM et la CPL-SM/SM. Après sélection, nous avons optimisé la séparation chromatographique et la détection de chacun des composés menant à l'analyse de 11 composés en CPG (pesticides organochlorés, phtalates et bisphénol A) et des 22 autres en CPL (pesticides organophosphorés, carbamates, fongicides, alkyphénols).

Une méthode d'analyse environnementale doit permettre la détection mais aussi la quantification des molécules d'intérêts. Après avoir évalué l'effet de matrice sur les effluents de STEP, nous avons choisi une technique de quantification rigoureuse, la méthode des ajouts dosés. La validation des limites de détection et de quantification des substances au sein de la matrice a été réalisée par étude statistique. Ainsi la méthode développée atteint des limites de détection comprises entre 7,2 ppt (ng.L^{-1}) et 1,27 ppb ($\mu\text{g.L}^{-1}$).

Ce protocole d'analyse abouti a ensuite été appliqué à des échantillons réels tels que des eaux de surface, des eaux souterraines et des eaux traitées permettant de révéler la présence de polluants majoritaires tels les alkyphénols et certains pesticides.

La suite des travaux nous a conduit à nous intéresser aux matrices solides représentées par les sols, les sédiments, les boues de STEP et les retombées atmosphériques. L'optimisation du protocole d'extraction des analytes à partir des boues de STEP a été expérimentée par l'application d'un plan d'expérience. Une matrice factorielle complète basée sur l'observation de la variation de quatre paramètres de l'extracteur accéléré par solvant (température, pression, durée et nombre de cycles) a permis de choisir le meilleur compromis pour les substances recherchées. La purification de l'extrait ainsi obtenu s'est révélée beaucoup plus délicate. Plusieurs techniques ont été évaluées, la CES, la chromatographie flash, l'extraction liquide-liquide et la SPE en phase inverse, mais c'est la SPE en phase normale sur silice mise au point sur les extraits aqueux qui nous a donnée entière satisfaction.

Finalement, les substances extraites des boues sont analysées par CPL, la CPG requérant un échantillon moins « chargé » en interférents. De la même manière que pour les extraits aqueux, l'effet de matrice a été évalué et compte tenu des forts effets de suppression d'ion constatés nous avons opté pour la méthode de quantification par les ajouts dosés sur les échantillons de boues de STEP. La validation statistique des limites de détection et de quantification a été réalisée sur les extraits dopés permettant de déduire des limites de détection comprises entre 5 ppb ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) et 1,7 ppm ($\mu\text{g.g}^{-1}$) dans les boues.

Enfin, cette méthode d'analyse performante a été appliquée à des échantillons réels aussi variés que des boues de STEP, des retombées atmosphériques, des dépôts de toiture et des sédiments de rivière. La présence de teneurs d'ultra-trace et de traces de plusieurs composés a été notée. Plus précisément, ces résultats ont permis de distinguer trois échantillons aqueux qui ont présentés des teneurs en pesticides supérieures à certaines normes du niveau de pollution des cours d'eau (ADEME-Rhône-Alpes). En l'absence de critère environnementale concernant les concentrations en polluants organiques dans les sols et les boues de STEP, nous pouvons considérer que la boue de

Conclusion

STEP analysée qui contient plus de 10 mg.kg^{-1} d'alkylphénols éthoxylés est polluée par ces perturbateurs endocriniens industriels. Néanmoins, il est nécessaire de préciser que le reste des échantillons analysés, aussi bien aqueux que solides, ont présentés des teneurs en polluants à l'état d'ultra-trace ou inférieures aux normes réglementaires environnementales lorsqu'elles sont disponibles.

Avec la mise au point et le développement de cette méthode d'analyse, le laboratoire possède maintenant une méthodologie analytique permettant une quantification multirésidus de 11 substances prioritaires ainsi que de 22 pesticides dans des matrices solides et aqueuses variées. S'inscrivant dans une démarche environnementale en pleine évolution réglementaire, ce protocole peut également s'appliquer à :

- un processus d'identification des risques environnementaux
- la réalisation d'études écotoxicologiques
- l'évaluation de procédés de dépollution

Afin de compléter ce projet de recherche, nous projetons d'aboutir prioritairement à la quantification des 11 derniers composés extraits à partir des matrices solides et analysés par CPG-SM. En effet, une quantité d'interférents encore trop importante est présente au sein de l'extrait. Nous avons décidé d'évaluer une purification sur phase solide incorporée au sein de la cellule d'extraction PLE. Enfin, nous souhaiterions également éprouver un protocole de purification par SPE innovant par l'emploi combiné et simultané de différentes phases solides telles que des silices greffées par des groupements NH_2 (amino) et CN (cyano).

ANNEXES

ANNEXE I

CLASSIFICATION DES SUBSTANCES CHIMIQUES EN EUROPE DEFINITIONS DES ACTES JURIDIQUES COMMUNAUTAIRES

EINECS :

European INventory of Existing Commercial chemical Substances, inventaire européen des substances. Cet inventaire répertorie les substances chimiques existantes avant 1981.

ELINCS :

European List of Notified Chemical Substances, liste européenne des substances chimiques notifiées. Cette liste concerne les « nouvelles » substances chimiques classées à partir de 1981.

Les règlements, les directives et les décisions communautaires constituent les actes dits contraignants créés une obligation juridique pour tous les destinataires.

Règlement :

Il s'agit d'un acte législatif arrêté par la Commission, véritable loi européenne qui précise les dispositions du droit communautaire. Le règlement fixe un objectif et les moyens pour l'atteindre Il est obligatoire dans tous ses élément et directement applicable dans tous les Etats membres. Il s'applique dès lors qu'il est publié au Journal officiel des Communautés (JOC), et vise à assurer l'application uniforme du droit communautaire dans tous les Etats membres. Il a aussi pour conséquence de rendre inapplicables les réglementations nationales incompatibles avec les clauses matérielles qu'il contient. Les dispositions législatives, réglementaires et administratives en vigueur dans les Etats membres ne sont licites que si le règlement le prévoit ou que son application efficace l'exige.

Directive :

Une directive de l'union européenne est un acte juridique adopté par le Conseil et le Parlement ou par la Commission seule. Elle s'adresse à un ou plusieurs Etats membres et représente une loi-cadre fixant des objectifs sans prescrire à l'Etat membre par quels moyens il doit les réaliser. Les Etats destinataires ont donc une obligation quant au résultat mais sont laissés libres quant aux moyens à mettre en œuvre pour y parvenir. Elle prévoit une date limite de transposition dans le droit national : les Etats-membres disposent, pour la transposition, d'une marge de manœuvre leur permettant de tenir compte des spécificités nationales. La transposition doit s'effectuer dans un délai fixé par la directive. Sa mise en œuvre se réalise selon les dispositions réglementaires de sa transposition en droit national. La cour de justice européenne peut sanctionner les Etats qui ne respecteraient pas leurs obligations. Les directives sont également publiées au JOC sont utilisées pour harmoniser les législations nationales, notamment pour la réalisation du marché unique (par exemple, les normes relatives à la sécurité des produits).

Décision de la Commission :

La décision européenne permet de réglementer les situations particulières. Elle n'oblige que les destinataires qu'elle désigne expressément : Etat(s) membre(s), entreprise(s) ou particulier(s). Comme les directives, les décisions peuvent comporter l'obligation pour un Etat membre de faire bénéficier le citoyen d'une position juridique plus favorable. Dans ce cas, le particulier ne peut faire valoir ses droits que si l'Etat membre en cause a pris un acte de transposition. Les décisions peuvent être directement applicables dans les mêmes conditions que les dispositions d'une directive.

Source : <http://www.touteurope.fr>, Les caractéristiques du droit communautaire

ANNEXE II

Règlementation, classification, emballage, étiquetage des substances et préparations dangereuses

Le but de la réglementation sur la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances et préparations dangereuses est d'assurer la protection des personnes, qui peuvent entrer en contact avec ces produits, et la protection de l'environnement. La classification permet de définir les différentes classes ou catégories de danger que peuvent présenter les substances et préparations. L'étiquetage est la première information, essentielle et concise, fournie à l'utilisateur sur ces dangers et sur les précautions à prendre lors de l'utilisation.

Les substances et les préparations sont considérées comme dangereuses, quand elles appartiennent à l'une des 15 catégories de danger suivante : Explosibles, Comburantes, Extrêmement inflammables, facilement inflammables, Inflammables, très toxiques, Toxiques, Nocives, Corrosives, irritantes, Sensibilisantes, Cancérogènes, Mutagènes, toxiques pour la reproduction, Dangereuses pour l'environnement.

A chaque catégorie de danger sont associés des symboles et indications de danger, et des phrases de risque R. Ces éléments constituent la classification d'une substance ou d'une préparation. Ils figurent sur l'étiquette réglementaire, accompagnés de conseils de prudence (phrases S) choisis en fonction des phrases de risque.

Phrases de risques et conseils de prudences

Nous présentons ci-dessous seulement les phrases nécessaires à la compréhension du tableau de l'annexe V :

Phrases-R simples

R 11 : Facilement inflammable

R 21 : Nocif par contact avec la peau

R 22 : Nocif en cas d'ingestion

R 24 : Toxique par contact avec la peau

R 25 : Toxique en cas d'ingestion

R 34 : Provoque des brûlures

R 37 : Irritant pour les voies respiratoires

R 38 : Irritant pour la peau

R 40 : Effet cancérogène suspecté - preuves insuffisantes

R 41 : Risque de lésions oculaires graves

R 43 : Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau

R 50 : Très toxique pour les organismes aquatiques

R 51 : Toxique pour les organismes aquatiques

R 53 : Peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique

R 60 : Peut altérer la fertilité

R 61 : Risque pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant

R 62 : Risque possible d'altération de la fertilité

R 63 : Risque possible pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant

Phrases-R combinées

R 21/22 Nocif par contact avec la peau et par ingestion

R 20/21/22 : Nocif par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion

R 23/24/25 : Toxique par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion

R 20/22 Nocif par inhalation et par ingestion

R 23/25 : Toxique par inhalation et par ingestion

R 26/28 : Très toxique par inhalation et par ingestion

R 36/37/38 : Irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau

R 36/38 Irritant pour les yeux et la peau

R 48/25 : Toxique : risque d'effets graves pour la santé en cas d'exposition prolongée par ingestion

R 50/53 : Très toxique pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique

R 51/53 : Toxique pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique

R48/25 : Toxique: risque d'effets graves pour la santé en cas d'exposition prolongée par ingestion.

Phrases-S simples

S 7 : Conserver le récipient bien fermé

S 22 : Ne pas respirer les poussières

S 23 : Ne pas respirer les gaz/vapeurs/fumées/aérosols (terme(s) approprié à indiquer par le fabricant)

S 24 : Eviter le contact avec la peau

S 26 : En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste

S 28 : Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec les produits appropriés à indiquer par le fabricant

S 36 : Porter un vêtement de protection approprié

S 37 : Porter de gants appropriés

S 38 : En cas de ventilation insuffisante, porter un appareil respiratoire approprié

S 45 : En cas d'accidents ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette)

S 46 : En cas d'ingestion, consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette

S 53 : Eviter l'exposition - se procurer des instructions spéciales avant l'utilisation

S 60 : Eliminer le produit et son récipient comme un déchet dangereux

S 61 : Eviter le rejet dans l'environnement. Consulter les instructions spéciales/la fiche de données de sécurité

Phrases-S combinées

S 36/37 : Porter un vêtement de protection et des gants appropriés

S 36/37/39 : Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage

Symboles de danger

Les symboles de dangers sont signalés par des carrés oranges dans lesquels des dessins en noir indiquent la nature du danger. Ils sont accompagnés d'annotations, soit un mot soit des lettres, qui précisent le type de danger.

Il est important de signaler que :




- tous les dangers ne sont pas signalés par ces symboles. La réglementation oblige les fabricants à signaler le danger le plus important uniquement. L'obligation d'apposer le symbole T rend facultatifs les symboles C et X. L'obligation d'apposer le symbole C rend facultatif le symbole X
- le fait qu'il n'y ait pas de symbole de danger sur l'emballage ne veut pas dire que le produit n'est pas dangereux. Il n'existe pas de pictogramme pour tous les dangers. Par exemple, il n'y a pas de pictogramme pour signaler les substances allergisantes ou cancérigènes ou toxiques pour la reproduction...

Il existe trois types de symboles de danger associés à 15 catégories différentes, nous présenterons les principales :




- Danger pour la santé
- Danger pour la sécurité
- Danger pour l'environnement

Le tableau suivant regroupe ces 3 types de dangers :


Danger pour la santé

	<p>Xn: nocif</p> <p>Substance pouvant, par inhalation, ingestion ou pénétration cutanée, entraîner la mort ou nuire à la santé de manière aiguë ou chronique.</p> <p>Exemples : BA, p,p DDE, prosulfocarbe, tétraconazole</p>	<p>Xi : irritant</p> <p>Substance non corrosives mais pouvant, par contact immédiat, prolongé ou répété avec la peau ou les muqueuses provoquer une réaction inflammatoire.</p> <p>Exemples : n-OP, HPTE, fluquinconazole</p>
	<p>T+ : très toxique</p> <p>Substance entraînant la mort par inhalation, ingestion ou pénétration cutanée en très petites quantités, ou nuisant à la santé de manière aiguë ou chronique.</p> <p>Exemple : méthamidophos</p>	<p>T : toxique</p> <p>Substance entraînant la mort par inhalation, ingestion ou pénétration cutanée en petites quantités, ou nuisant à la santé de manière aiguë ou chronique.</p> <p>Exemples : DBP, DEHP, diméthoate, o,p DDE, propoxur, pyridabène</p>
	<p>C : corrosif</p> <p>Substance pouvant, en contact avec des tissus vivants, exercer une action destructrice sur ces derniers.</p> <p>Exemple : 4-NP</p>	

Danger pour la sécurité

	<p>O : comburant</p> <p>Substance présentant, au contact d'autres substances, notamment inflammables, une réaction fortement exothermique.</p>	
	<p>F+: extrêmement inflammable</p> <p>Substance et préparations liquides dont le point d'éclair est extrêmement bas, ainsi que substances et préparations gazeuses qui, à température et pressions ambiantes, sont inflammables à l'air.</p>	<p>F: facilement inflammable</p> <p>Substances et préparations qui peuvent s'échauffer au point de s'enflammer à l'air à température ambiante sans apport d'énergie ; à l'état solide, qui peuvent s'enflammer facilement par une brève action d'une source d'inflammation et continuer à brûler ou à se consumer après l'éloignement de cette source ; ou qui, au contact de l'eau ou de l'air humide, produisent des gaz extrêmement inflammables en quantités dangereuses</p>
	<p>E: explosif</p> <p>Substance et préparations solides, liquides, pâteuses, ou gélatineuse qui, même sans intervention d'oxygène atmosphérique, peuvent présenter une réaction exothermique avec développement rapide de gaz et qui, dans des conditions d'essais déterminés, détonnent, déflagrent rapidement ou, sous l'effet de la chaleur, explosent en cas de confinement partiel.</p>	

Danger pour l'environnement

	<p>N: danger pour l'environnement</p> <p>Substance pouvant présenter un risque immédiat ou différé pour une ou plusieurs composantes de l'environnement.</p> <p>Exemples : tert-OP, 4-NP, DBP, p,p DDD, 2-Imidazolidinethione, hexaconazole, diméthomorphe</p>	
---	---	--

Source : Note ED 982 de l'INRS disponible à partir de <http://www.inrs.fr/dossiers/etiquetage.html>

I

(Actes dont la publication est une condition de leur applicabilité)

RÈGLEMENT (CE) N° 1907/2006 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL

du 18 décembre 2006

concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), instituant une agence européenne des produits chimiques, modifiant la directive 1999/45/CE et abrogeant le règlement (CEE) n° 793/93 du Conseil et le règlement (CE) n° 1488/94 de la Commission ainsi que la directive 76/769/CEE du Conseil et les directives 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE et 2000/21/CE de la Commission

LE PARLEMENT EUROPÉEN ET LE CONSEIL DE L'UNION EUROPÉENNE,

vu le traité instituant la Communauté européenne, et notamment son article 95,

vu la proposition de la Commission,

vu l'avis du Comité économique et social européen , ¹

vu l'avis du Comité des régions , ²

statuant conformément à la procédure visée à l'article 251 du traité , ³

¹ JO C 112 du 30.4.2004, p. 92, et JO C 294 du 25.11.2005, p. 38.

² JO C 164 du 5.7.2005, p. 78.

³ Avis du Parlement européen du 17 novembre 2005 (non encore paru au Journal officiel), position commune du Conseil du 27 juin 2006 (JO C 267 E du 14.11.2006, p. 1) et position du Parlement européen du 13 décembre 2006 (non encore parue au Journal officiel).
Décision du Conseil du 18 décembre 2006.

considérant ce qui suit:

- (1) Le présent règlement devrait assurer un niveau élevé de protection de la santé humaine et de l'environnement ainsi que la libre circulation des substances, telles qu'elles ou contenues dans des préparations ou des articles, tout en améliorant la compétitivité et l'innovation. Le présent règlement devrait aussi promouvoir le développement de méthodes alternatives pour l'évaluation des dangers liés aux substances.
- (2) Le fonctionnement efficace du marché intérieur des substances ne peut être assuré que s'il n'existe pas, d'un État membre à l'autre, de différences significatives entre les exigences applicables aux substances.
- (3) Un niveau élevé de protection de la santé humaine et de l'environnement devrait être assuré dans le cadre du rapprochement des dispositions législatives relatives aux substances, dans le but de parvenir à un développement durable. Cette législation devrait être appliquée d'une manière non discriminatoire, que les substances fassent l'objet d'échanges dans le marché intérieur ou au niveau international dans le respect des engagements internationaux de la Communauté.
- (4) Conformément au plan de mise en œuvre du Sommet mondial de Johannesburg pour le développement durable, adopté le 4 septembre 2002, l'Union européenne s'emploie à ce que, d'ici à 2020, les produits chimiques soient produits et utilisés de manière à ce que les effets néfastes graves sur la santé humaine et sur l'environnement soient réduits au minimum.

- (5) Le présent règlement devrait s'appliquer sans préjudice des dispositions de droit communautaire relatives au lieu de travail et à l'environnement.
- (6) Le présent règlement devrait contribuer à mettre en œuvre l'approche stratégique de la gestion internationale des produits chimiques (SAICM) adoptée le 6 février 2006 à Dubaï.
- (7) Pour préserver l'intégrité du marché intérieur et assurer un niveau élevé de protection de la santé humaine, en particulier celle des travailleurs, ainsi que de l'environnement, il est nécessaire de veiller à ce que la fabrication de substances dans la Communauté soit conforme au droit communautaire, même si ces substances sont exportées.
- (8) Il y a lieu de tenir compte particulièrement de l'incidence potentielle du présent règlement sur les petites et moyennes entreprises (PME) et de la nécessité d'éviter qu'elles aient à subir une quelconque discrimination.

- (9) L'évaluation du fonctionnement des quatre principaux instruments juridiques régissant les substances dans la Communauté, à savoir la directive 67/548/CEE du Conseil du 27 juin 1967 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses ¹, la directive 76/769/CEE du 27 juillet 1976 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres relatives à la limitation de la mise sur le marché et de l'emploi de certaines substances et préparations dangereuses ², la directive 1999/45/CE du Parlement européen et du Conseil du 31 mai 1999 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres relatives à la classification, à l'emballage et à l'étiquetage des préparations dangereuses ³ et le règlement (CEE) n° 793/93 du Conseil du 23 mars 1993 concernant l'évaluation et le contrôle des risques présentés par les substances existantes ⁴, a permis d'identifier un certain nombre de problèmes dans le fonctionnement de la législation communautaire relative aux substances chimiques, qui se traduisent par des disparités entre les dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres, affectant directement le fonctionnement du marché intérieur dans ce domaine, et a mis en lumière la nécessité de consacrer davantage d'efforts à la protection de la santé publique et de l'environnement, conformément au principe de précaution.

¹ JO L 196 du 16.8.1967, p. 1. Directive modifiée en dernier lieu par la directive 2004/73/CE de la Commission (JO L 152 du 30.4.2004, p. 1). Rectificatif dans le JO L 216 du 16.6.2004, p. 3.

² JO L 262 du 27.9.1976, p. 201. Directive modifiée en dernier lieu par la directive 2005/90/CE du Parlement européen et du Conseil (JO L 33 du 4.2.2006, p. 28).

³ JO L 200 du 30.7.1999, p. 1. Directive modifiée en dernier lieu par la directive 2006/8/CE de la Commission (JO L 19 du 24.1.2006, p. 12).

⁴ JO L 84 du 5.4.1993, p. 1. Règlement modifié par le règlement (CE) n° 1882/2003 du Parlement européen et du Conseil (JO L 284 du 31.10.2003, p. 1).

- (10) Les substances soumises à un contrôle douanier qui se trouvent en dépôt temporaire, dans des zones franches ou des entrepôts francs en vue d'une réexportation ou en transit ne sont pas utilisées au sens du présent règlement et devraient donc être exclues de son champ d'application. Il convient également d'exclure de son champ d'application le transport de substances dangereuses et de préparations dangereuses par chemin de fer, route, voie de navigation intérieure, mer ou air, étant donné que des dispositions spécifiques s'appliquent déjà à ce transport.
- (11) Pour assurer la praticabilité et maintenir les incitations au recyclage et à la valorisation des déchets, il convient de ne pas considérer les déchets comme des substances, des préparations ou des articles au sens du présent règlement.
- (12) Un objectif important du nouveau système établi par le présent règlement est d'inciter et, dans certains cas, de veiller à ce que les substances très préoccupantes soient remplacées à terme par des substances ou des technologies moins dangereuses lorsque des solutions de remplacement appropriées économiquement et techniquement viables existent. Le présent règlement est sans effet sur l'application des directives relatives à la protection des travailleurs et à l'environnement, et notamment de la directive 2004/37/CE du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents cancérigènes ou mutagènes au travail (sixième directive particulière au sens de l'article 16, paragraphe 1, de la directive 89/391/CEE du Conseil)¹ et de la directive 98/24/CE du Conseil du 7 avril 1998 concernant la protection de la santé et de la sécurité des travailleurs contre les risques liés à des agents chimiques sur le lieu de travail (quatorzième directive particulière au sens de l'article 16, paragraphe 1, de la directive 89/391/CEE)², qui font obligation aux employeurs d'éliminer les substances dangereuses, lorsque cela est techniquement possible, ou de les remplacer par des substances moins dangereuses.

¹ JO L 158 du 30.4.2004, p. 50. Rectificatif dans le JO L 29 du 29.6.2004, p. 23.
² JO L 131 du 5.5.1998, p. 11.

- (13) Le présent règlement devrait s'appliquer sans préjudice des interdictions et restrictions fixées par la directive 76/768/CEE du Conseil du 27 juillet 1976 concernant le rapprochement des législations des États membres relatives aux produits cosmétiques dans ¹ la mesure où les substances sont utilisées et commercialisées en tant qu'ingrédients cosmétiques et relèvent du champ d'application du présent règlement. La disparition progressive des essais sur des animaux vertébrés dans le but de protéger la santé humaine au sens de la directive 76/768/CEE devrait s'appliquer à l'utilisation de ces substances dans les cosmétiques.
- (14) Le présent règlement produira des informations sur les substances et leurs utilisations. Les informations disponibles, y compris celles produites en vertu du présent règlement, devraient être utilisées par les acteurs concernés pour l'application et la mise en œuvre de la législation communautaire adéquate, comme celle sur les produits, ainsi que des instruments communautaires volontaires, comme le programme d'étiquetage écologique. Lors de la révision et de l'élaboration de la législation communautaire et des instruments volontaires pertinents, la Commission devrait envisager les possibilités d'utilisation qu'offrent les informations produites en vertu du présent règlement et envisager la création d'une marque européenne de qualité.

¹ JO L 262 du 27.9.1976, p. 169. Directive modifiée en dernier lieu par la directive 2005/80/CE de la Commission (JO L 303 du 22.11.2005, p. 32).

- (15) Il est nécessaire d'assurer une gestion efficace des aspects techniques, scientifiques et administratifs du présent règlement au niveau communautaire. Il convient, dès lors, de créer une entité centrale chargée d'assurer cette fonction. Une étude de faisabilité portant sur les besoins en ressources d'une entité centrale a conclu qu'une entité centrale indépendante présentait un certain nombre d'avantages à long terme par rapport à d'autres options. Une agence européenne des produits chimiques (ci-après dénommée "l'Agence"), devrait, dès lors, être instituée.
- (16) Le présent règlement fixe les devoirs et les obligations des fabricants, des importateurs et des utilisateurs en aval des substances telles quelles et des substances contenues dans des préparations ou des articles. Il est fondé sur le principe que le secteur doit produire, importer ou utiliser des substances ou les mettre sur le marché de façon responsable et avec la prudence nécessaire pour éviter, dans des conditions raisonnablement prévisibles, les effets néfastes sur la santé humaine et l'environnement.
- (17) Toutes les informations disponibles et pertinentes sur les substances telles quelles et les substances contenues dans des préparations ou des articles devraient être recueillies pour contribuer à l'identification de leurs propriétés dangereuses, et des recommandations concernant les mesures de gestion des risques devraient être systématiquement communiquées par le canal des chaînes d'approvisionnement, dans la mesure de ce qui est raisonnablement nécessaire, pour éviter les effets néfastes sur la santé humaine et l'environnement. En outre, la communication de conseils techniques en soutien à la gestion des risques devrait, le cas échéant, être encouragée dans la chaîne d'approvisionnement.
- (18) La responsabilité de la gestion des risques liés aux substances devrait être supportée par les personnes physiques ou morales qui fabriquent, importent, mettent sur le marché ou utilisent ces substances. Les informations concernant la mise en œuvre du présent règlement devraient être aisément accessibles, en particulier pour les PME.

- (19) Par conséquent, les dispositions relatives à l'enregistrement devraient faire obligation aux fabricants et aux importateurs de produire des données sur les substances qu'ils fabriquent ou importent, d'utiliser ces données pour évaluer les risques liés à ces substances, ainsi que de développer et de recommander des mesures appropriées de gestion des risques. Pour garantir qu'ils remplissent effectivement ces obligations, et pour des raisons de transparence, les opérateurs qui demandent un enregistrement devraient présenter à l'Agence un dossier contenant l'ensemble des informations précitées. Les substances enregistrées devraient pouvoir circuler sur le marché intérieur.
- (20) Les dispositions relatives à l'évaluation devraient prévoir un suivi de l'enregistrement en autorisant la réalisation de contrôles pour vérifier la conformité des enregistrements aux prescriptions du présent règlement et en permettant si nécessaire aux opérateurs de produire des informations supplémentaires sur les propriétés des substances. Si l'Agence, en coopération avec les États membres, estime qu'il y a lieu de penser qu'une substance constitue un risque pour la santé humaine ou l'environnement, elle devrait, après avoir inscrit la substance dans le plan d'action continu communautaire d'évaluation des substances, veiller à ce que cette substance soit évaluée, en s'en remettant aux autorités compétentes des États membres.
- (21) Bien que les informations fournies sur les substances grâce à l'évaluation devraient être utilisées en premier lieu par les fabricants et les importateurs pour gérer les risques liés à leurs substances, ces informations peuvent également être exploitées pour lancer les procédures d'autorisation ou de restriction au titre du présent règlement ou des procédures de gestion des risques au titre d'autres actes législatifs communautaires. Il convient, par conséquent, de veiller à ce que ces informations soient à la disposition des autorités compétentes et qu'elles puissent être utilisées par lesdites autorités aux fins de ces procédures.

- (22) L'autorisation devrait assurer le bon fonctionnement du marché intérieur tout en garantissant une bonne maîtrise des risques résultant de substances extrêmement préoccupantes. La Commission ne devrait octroyer l'autorisation de mise sur le marché et d'utilisation que si les risques liés à leur utilisation sont valablement maîtrisés, lorsque cela est possible, ou si l'utilisation peut être justifiée par des raisons socio-économiques et s'il n'existe aucune solution de remplacement appropriée qui soit économiquement et techniquement viable.
- (23) Les dispositions relatives aux restrictions devraient prévoir que la fabrication, la mise sur le marché et l'utilisation de substances qui présentent des risques nécessitant des mesures peuvent faire l'objet d'interdictions totales ou partielles ou d'autres restrictions, sur la base d'une évaluation de ces risques.
- (24) Dans la perspective du présent règlement, la Commission a lancé des projets de mise en œuvre de REACH (PMR) associant des experts de groupes de parties intéressées. Certains de ces projets visent l'élaboration de projets d'orientations et d'outils destinés à aider la Commission, l'Agence, les États membres, les fabricants, les importateurs et les utilisateurs en aval à s'acquitter concrètement des obligations que leur impose le présent règlement. Ces travaux devraient permettre à la Commission et à l'Agence de communiquer en temps utile des orientations techniques appropriées concernant les délais introduits par le présent règlement.

- (25) La responsabilité de l'évaluation des risques et des dangers liés aux substances devrait incomber, en premier lieu, aux personnes physiques ou morales qui fabriquent ou importent ces substances, mais uniquement lorsque les quantités fabriquées ou importées dépassent un certain seuil, afin que les intéressés puissent assumer la part de responsabilité qui leur revient. Les personnes physiques ou morales qui manipulent des substances devraient prendre les mesures nécessaires de gestion des risques, conformément à l'évaluation des risques liés aux substances, et transmettre les recommandations pertinentes le long de la chaîne d'approvisionnement. Elles devraient notamment décrire, documenter et communiquer d'une manière appropriée et transparente les risques liés à la production, à l'utilisation et à l'élimination de chaque substance.
- (26) Pour qu'ils puissent réaliser de manière efficace l'évaluation de la sécurité chimique des substances, les fabricants et importateurs de substances devraient se procurer des informations sur ces substances, si nécessaire en procédant à de nouveaux essais.
- (27) Pour les besoins de la mise en œuvre et de l'évaluation, et pour des raisons de transparence, les informations relatives à ces substances, ainsi que des informations connexes, portant notamment sur les mesures de gestion des risques, devraient normalement être soumises aux autorités.

- (28) Les activités de recherche et de développement scientifiques utilisent normalement des quantités inférieures à 1 tonne par an. Il n'est pas nécessaire de prévoir une exemption pour ces activités, puisque les substances utilisées dans de telles quantités ne doivent de toute manière pas être enregistrées. Toutefois, pour encourager l'innovation, les activités de recherche et de développement axées sur les produits et les processus devraient être exemptées de l'obligation d'enregistrement pendant une certaine période, au cours de laquelle une substance n'est pas encore destinée à être mise sur le marché à l'intention d'un nombre indéfini de clients, parce que son application dans des préparations ou des articles exige encore que des activités de recherche et de développement supplémentaires soient réalisées par le déclarant potentiel lui-même ou en coopération avec un nombre limité de clients connus. Il convient, en outre, de prévoir une exemption analogue pour les utilisateurs en aval qui utilisent la substance à des fins d'activités de recherche et de développement axées sur les produits et les processus, à condition que les risques pour la santé humaine et l'environnement soient valablement maîtrisés conformément aux prescriptions de la législation relative à la protection des travailleurs et à l'environnement.
- (29) Étant donné que les producteurs et les importateurs d'articles devraient être responsables de leurs articles, il convient d'imposer une obligation d'enregistrement concernant les substances qui sont destinées à être rejetées par des articles et qui n'ont pas été enregistrées à cet effet. Dans le cas de substances extrêmement préoccupantes présentes dans des articles dans des quantités ou des concentrations supérieures aux seuils prévus, si une exposition à la substance ne peut pas être exclue et si personne n'a enregistré la substance pour cette utilisation, il convient d'en informer l'Agence. L'Agence devrait en outre être habilitée à exiger la présentation d'une demande d'enregistrement si elle a des raisons de penser que le rejet d'une substance par l'article peut présenter un risque pour la santé humaine ou l'environnement et que la substance est présente dans ces articles dans des quantités supérieures au total à 1 tonne par producteur ou importateur par an. L'Agence devrait examiner la nécessité d'une proposition de restriction si elle estime que l'utilisation de ces substances dans des articles présente un risque pour la santé humaine ou pour l'environnement qui n'est pas valablement maîtrisé.

- (30) Les prescriptions régissant la réalisation d'évaluations de la sécurité chimique par les fabricants et les importateurs devraient être définies en détail dans une annexe technique pour permettre à ceux-ci de satisfaire à leurs obligations. Pour que la charge soit répartie équitablement entre eux-mêmes et leurs clients, les fabricants et les importateurs devraient faire porter leur évaluation de la sécurité chimique non seulement sur leurs propres utilisations et les utilisations en vue desquelles ils mettent leurs substances sur le marché, mais également sur l'ensemble des utilisations que leurs clients leur demandent de couvrir.
- (31) La Commission, en étroite collaboration avec le secteur, les États membres et d'autres acteurs concernés, devrait élaborer des orientations pour le respect des obligations prévues dans le cadre du présent règlement en rapport avec les préparations (notamment en ce qui concerne les fiches de données de sécurité comportant des scénarios d'exposition), y compris l'évaluation des substances incorporées dans des préparations spéciales telles que les métaux incorporés dans les alliages. Ce faisant, la Commission devrait tenir pleinement compte des travaux qui auront été réalisés dans le cadre des PMR et inscrire les orientations nécessaires en la matière dans le paquet global d'orientations sur REACH. Ces orientations devraient être disponibles avant l'application du présent règlement.
- (32) Une évaluation de la sécurité chimique ne devrait pas obligatoirement être effectuée pour les substances contenues dans des préparations en certaines concentrations très faibles dont il est estimé qu'elles ne suscitent aucune préoccupation. Les substances contenues dans des préparations dans des concentrations aussi faibles devraient également être exemptées de l'obligation d'autorisation. Ces dispositions devraient également être applicables aux préparations qui sont des mélanges solides de substances jusqu'à ce que leur soit donnée une forme particulière qui les transforme en article.

- (33) La soumission conjointe et le partage d'informations sur les substances devraient être prévus afin de renforcer l'efficacité du système d'enregistrement, de réduire les coûts et de réduire les essais sur les animaux vertébrés. Un membre d'un groupe de déclarants devrait soumettre des informations pour le compte des autres membres, dans le respect de certaines règles assurant que toutes les informations requises sont communiquées, tout en permettant un partage de coûts. Un déclarant devrait pouvoir soumettre directement des informations à l'Agence dans certains cas précis.
- (34) Les exigences relatives à la production d'informations sur les substances devraient être modulées en fonction des quantités dans lesquelles les substances sont fabriquées ou importées, car ces quantités donnent une indication du risque d'exposition de l'être humain et de l'environnement à ces substances, et devraient faire l'objet d'une description détaillée. Pour réduire les éventuelles répercussions sur les substances présentes en faibles quantités, les informations toxicologiques et écotoxicologiques devraient uniquement être exigées pour les substances prioritaires dont les quantités sont comprises entre 1 et 10 tonnes. Pour les autres substances présentes dans des quantités comprises dans cet intervalle, il conviendrait de prévoir des mesures d'incitation pour encourager les fabricants et les importateurs à fournir ces informations.
- (35) Les États membres, l'Agence et toutes les parties intéressées devraient tenir pleinement compte des résultats des PMR, en particulier en ce qui concerne l'enregistrement des substances présentes dans la nature.
- (36) Il convient d'envisager l'application de l'article 2, paragraphe 7, points a) et b), et de l'annexe XI aux substances dérivées de processus de transformation minéralogique et il devrait en être pleinement tenu compte lors du réexamen des annexes IV et V.

- (37) Si des essais sont effectués, ils devraient être conformes aux exigences pertinentes de la protection des animaux de laboratoire, énoncées dans la directive 86/609/CEE du Conseil du 24 novembre 1986 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres relatives à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques, et, dans le cas d'essais écotoxicologiques et toxicologiques, aux bonnes pratiques de laboratoire, exposées dans la directive 2004/10/CE du Parlement européen et du Conseil du 11 février 2004 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à l'application des principes de bonnes pratiques de laboratoire et au contrôle de leur application pour les essais sur les substances . ²
- (38) La production d'informations par d'autres moyens donnant des résultats équivalents à ceux des essais et des méthodes d'essai prescrits devrait également être autorisée, par exemple lorsque ces informations proviennent de modèles de relations qualitatives ou quantitatives structure-activité valables ou de substances structurellement proches. À cet effet, l'Agence devrait élaborer, en coopération avec les États membres et les parties intéressées, des orientations appropriées. Il devrait également être possible de ne pas communiquer certaines informations si cela peut être dûment justifié. Sur la base de l'expérience acquise par le biais des PMR, il convient d'élaborer des critères définissant ce qui constitue une telle justification.
- (39) Outre les documents d'orientation opérationnelle fournis par l'Agence, les États membres devraient mettre en place des services nationaux d'assistance technique afin d'aider les entreprises, et en particulier les PME, à se conformer aux exigences du présent règlement.

¹ JO L 358 du 18.12.1986, p. 1. Directive modifiée par la directive 2003/65/CE du Parlement européen et du Conseil (JO L 230 du 16.9.2003, p. 32).

² JO L 50 du 20.2.2004, p. 44.

- (40) La Commission, les États membres, le secteur et les autres acteurs devraient continuer à contribuer à la promotion de méthodes d'essai de remplacement aux niveaux international et national, y compris les méthodes assistées par ordinateur, les méthodes in vitro, par exemple, le cas échéant, celles reposant sur la toxicogénomique et d'autres méthodes pertinentes. La stratégie de la Communauté visant à promouvoir des méthodes d'essai de remplacement constitue une priorité et la Commission devrait veiller, dans le contexte de ses programmes-cadres de recherche à venir et dans celui d'initiatives comme le plan d'action de la Communauté relatif à la protection et au bien-être des animaux 2006-2010, à ce que ce statut soit maintenu. La participation des acteurs ainsi que des initiatives faisant appel à toutes les parties intéressées devrait être recherchée.
- (41) Pour des raisons de praticabilité et en raison de leur nature particulière, les intermédiaires devraient faire l'objet de prescriptions spécifiques en matière d'enregistrement. Les polymères devraient être exemptés d'enregistrement et d'évaluation en attendant que ceux qui doivent être enregistrés en raison des risques qu'ils représentent pour la santé humaine ou l'environnement puissent être sélectionnés d'une manière efficace et économique sur la base de critères techniques et scientifiques valables.
- (42) Pour éviter que les autorités et les personnes physiques ou morales soient surchargées par le travail résultant de l'enregistrement des substances bénéficiant d'un régime transitoire qui se trouvent déjà sur le marché intérieur, cet enregistrement devrait être étalé sur une période appropriée, sans qu'il en résulte toutefois de retard excessif. Aussi convient-il de fixer des délais pour l'enregistrement de ces substances.
- (43) Les données relatives aux substances déjà notifiées conformément à la directive 67/548/CEE devraient être insérées progressivement dans le système et être revues à la hausse lorsque le seuil de quantité immédiatement supérieur est atteint.

- (44) L'harmonisation et la simplicité du système exigent que tous les enregistrements soient soumis à l'Agence. Pour garantir une approche cohérente et une utilisation efficace des ressources, l'Agence devrait soumettre chaque enregistrement à un contrôle du caractère complet et assumer la responsabilité de tout rejet définitif d'un enregistrement.
- (45) L'inventaire des substances chimiques existant sur le marché communautaire (EINECS) ayant regroupé certaines substances complexes dans une entrée unique, les substances UVCB (substances de composition inconnue ou variable, produits de réactions complexes ou matériels biologiques) peuvent, pour les mêmes raisons, être enregistrées comme une substance unique dans le cadre du présent règlement, malgré leur composition variable, à condition que les propriétés dangereuses ne diffèrent pas considérablement et garantissent la même classification.
- (46) Pour assurer que les informations collectées via l'enregistrement sont tenues à jour, il convient de prévoir que les déclarants sont tenus d'informer l'Agence de certains changements apportés aux dites informations.

- (47) Conformément à la directive 86/609/CEE, il est nécessaire de remplacer, de réduire ou d'affiner les essais sur les animaux vertébrés. La mise en œuvre du présent règlement devrait chaque fois que possible reposer sur le recours à des méthodes d'essai de remplacement adaptées à l'évaluation des dangers présentés par les substances chimiques pour la santé et pour l'environnement. Il convient d'éviter l'utilisation d'animaux en recourant à d'autres méthodes validées par la Commission ou par des organismes internationaux ou reconnues par la Commission ou par l'Agence comme étant de nature à satisfaire aux exigences d'information prévues par le présent règlement. À cette fin, la Commission, après consultation des acteurs concernés, devrait proposer de modifier le futur règlement de la Commission relatif aux méthodes d'essai ou le présent règlement, le cas échéant, en vue de remplacer, de réduire ou d'affiner les méthodes d'essai sur animaux. La Commission et l'Agence devraient veiller à ce que la réduction des expériences sur animaux constitue un élément-clé du développement et de l'actualisation des orientations destinées aux parties concernées ainsi que dans les procédures de l'Agence.
- (48) Le présent règlement ne devrait pas porter préjudice à l'application pleine et entière des règles communautaires de concurrence.
- (49) En vue d'éviter tout double emploi, et notamment de réduire les essais sur les animaux vertébrés, les dispositions relatives à l'élaboration et à la présentation des enregistrements et des mises à jour devraient prescrire un partage d'informations lorsqu'il est demandé par un déclarant. Si les informations concernent les animaux vertébrés, le déclarant devrait être tenu de le demander.

- (50) Il est conforme à l'intérêt public d'assurer une diffusion aussi rapide que possible des résultats des essais portant sur les risques que présentent certaines substances pour la santé humaine ou pour l'environnement, à l'intention des personnes physiques ou morales qui utilisent ces substances, afin de limiter les risques éventuellement liés à cette utilisation. Le partage des informations devrait, s'il est demandé par un déclarant, avoir lieu dans des conditions assurant une indemnisation équitable à la société qui a effectué les essais, en particulier en cas d'informations requérant des essais sur des animaux vertébrés.
- (51) Afin de renforcer la compétitivité de l'industrie communautaire et de permettre une efficacité optimale de l'application du présent règlement, il convient de prévoir le partage des données entre déclarants sur la base d'une indemnisation équitable.
- (52) Afin de respecter les droits de propriété légitimes des opérateurs qui produisent des données d'essais, le propriétaire de ces données devrait avoir le droit, pendant une période de douze ans, de recevoir une indemnisation des déclarants bénéficiant de ces données.
- (53) Pour permettre à un déclarant potentiel d'une substance bénéficiant d'un régime transitoire d'introduire sa demande d'enregistrement, même s'il ne peut parvenir à un accord avec un déclarant antérieur, l'Agence devrait, sur demande, autoriser l'utilisation de résumés ou de résumés d'études consistants des essais qui ont déjà été communiqués. Le déclarant qui reçoit ces données devrait être tenu de participer aux coûts supportés par le propriétaire des données. Pour les substances ne bénéficiant pas d'un régime transitoire, l'Agence peut demander la preuve de ce qu'un déclarant potentiel a payé le propriétaire de l'étude avant que l'Agence autorise le déclarant potentiel à utiliser cette information dans sa demande d'enregistrement.

- (54) Pour éviter tout double emploi, surtout en matière d'essais, les déclarants de substances bénéficiant d'un régime transitoire devraient effectuer, dès que possible, un enregistrement préalable dans une base de données gérée par l'Agence. Il convient de mettre en place un système de forums d'échange d'informations sur les substances (FEIS) pour faciliter l'échange d'informations sur les substances enregistrées. Au nombre des participants au FEIS devraient figurer tous les acteurs concernés qui soumettent des informations à l'Agence sur une même substance bénéficiant d'un régime transitoire. Parmi ceux-ci devraient compter les déclarants potentiels, qui doivent fournir et recevoir toute information pertinente relative à l'enregistrement de leurs substances, et les autres participants, qui peuvent recevoir une compensation financière pour les études qui sont en leur possession, mais qui ne sont pas habilités à demander des informations. Afin d'assurer le bon fonctionnement de ce système, les déclarants devraient respecter certaines obligations. Si un membre d'un FEIS ne respecte pas ses obligations, il devrait être sanctionné en conséquence, mais les autres membres devraient être autorisés à poursuivre l'élaboration de leur propre enregistrement. Si une substance n'a pas été préenregistrée, des mesures doivent être prises pour aider les utilisateurs en aval à trouver d'autres sources d'approvisionnement.
- (55) Il conviendrait d'encourager les fabricants et les importateurs d'une substance telle quelle ou contenue dans une préparation à communiquer avec les utilisateurs en aval de ladite substance au sujet de leur intention d'enregistrer la substance. Ces informations devraient être communiquées aux utilisateurs en aval suffisamment tôt avant l'échéance d'enregistrement lorsque le fabricant ou l'importateur n'entend pas enregistrer la substance, afin de permettre à l'utilisateur en aval de rechercher d'autres sources d'approvisionnement.

- (56) La responsabilité de la gestion des risques liés aux substances qui incombe aux fabricants ou aux importateurs suppose notamment la communication d'informations sur ces substances à d'autres professionnels, tels que les utilisateurs en aval ou les distributeurs. En outre, les producteurs ou les importateurs d'articles devraient fournir des informations concernant l'utilisation en toute sécurité des articles aux utilisateurs industriels et professionnels, ainsi qu'aux consommateurs à la demande. Cette importante responsabilité devrait s'appliquer également tout au long de la chaîne d'approvisionnement pour permettre à tous les acteurs de s'acquitter de leurs obligations en matière de gestion des risques résultant de l'utilisation de substances.
- (57) Comme la fiche de données de sécurité existante est d'ores et déjà utilisée comme instrument de communication dans la chaîne d'approvisionnement des substances et des préparations, il convient de la développer davantage et d'en faire une partie intégrante du système établi par le présent règlement.
- (58) En vue d'établir une chaîne de responsabilités, les utilisateurs en aval devraient être responsables de l'évaluation des risques résultant des utilisations auxquelles ils affectent les substances si ces utilisations ne sont pas couvertes par une fiche de données de sécurité communiquée par leurs fournisseurs, à moins que l'utilisateur en aval concerné ne prenne plus de mesures de protection que son fournisseur n'en recommande ou à moins que son fournisseur ne soit pas tenu d'évaluer ces risques ou de lui fournir des informations sur ces risques. Pour la même raison, les utilisateurs en aval devraient gérer les risques résultant des utilisations auxquelles ils affectent les substances. Il convient, en outre, que tout producteur ou tout importateur d'un article contenant une substance extrêmement préoccupante fournisse des informations suffisantes pour permettre l'utilisation dudit article en toute sécurité.

- (59) Les prescriptions relatives à la réalisation d'évaluations de la sécurité chimique par les utilisateurs en aval devraient également être énoncées en détail pour permettre à ces utilisateurs de satisfaire à leurs obligations. Ces exigences ne devraient s'appliquer qu'au-dessus d'une quantité totale de 1 tonne de substance ou de préparation. Cependant, les utilisateurs en aval devraient, dans tous les cas, examiner l'utilisation de la substance et déterminer et appliquer toute mesure appropriée de gestion des risques. Ils devraient communiquer à l'Agence certaines informations de base concernant l'utilisation.
- (60) Pour les besoins de la mise en œuvre et de l'évaluation, les utilisateurs en aval des substances devraient être tenus de communiquer à l'Agence certaines informations de base si leur utilisation ne fait pas partie des conditions du scénario d'exposition décrit en détail dans la fiche de données de sécurité communiquée par le fabricant ou l'importateur initial, et de maintenir à jour les informations communiquées.
- (61) Pour des raisons de praticabilité et de proportionnalité, il convient d'exempter de cette obligation de communication les utilisateurs en aval qui utilisent une substance en faibles quantités.
- (62) Il convient de faciliter la communication en aval et en amont de la chaîne d'approvisionnement. La Commission devrait mettre au point un système de classement fournissant de brèves descriptions générales des utilisations en tenant compte des résultats des PMR.
- (63) Il est également nécessaire de veiller à ce que la production d'informations soit adaptée aux besoins réels en informations. À cet effet, il devrait être fait obligation à l'Agence de statuer, dans le cadre de l'évaluation, sur les programmes d'essais proposés par les fabricants et les importateurs. En coopération avec les États membres, l'Agence devrait donner la priorité à certaines substances, en particulier celles qui peuvent être extrêmement préoccupantes.

- (64) Afin d'éviter de réaliser des essais inutiles sur les animaux, les parties prenantes devraient disposer d'une période de 45 jours pour fournir des informations et des études scientifiquement valables portant sur la substance en question et le point critique d'évaluation faisant l'objet de la proposition d'essai. Les informations et les études scientifiquement valables reçues par l'Agence devraient être prises en compte pour les décisions relatives aux propositions d'essais.
- (65) En outre, il est nécessaire d'instaurer la confiance dans la qualité générale des enregistrements et de veiller à ce que l'ensemble du public et toutes les parties intéressées de l'industrie chimique aient l'assurance du respect, par les personnes physiques ou morales, des obligations qui leur sont imposées. En conséquence, il convient donc de prendre des dispositions pour enregistrer quelles informations ont été réexaminées par un évaluateur ayant une expérience appropriée et l'Agence devrait contrôler la conformité d'un certain pourcentage d'enregistrements.
- (66) L'Agence devrait également être habilitée à réclamer aux fabricants, aux importateurs ou aux utilisateurs en aval des informations supplémentaires sur les substances suspectées de présenter un risque pour la santé ou l'environnement, y compris en raison de leur présence en grandes quantités sur le marché intérieur, sur la base des évaluations réalisées. Il convient, en se fondant sur les critères établis par l'Agence en coopération avec les États membres pour la détermination des substances prioritaires, d'établir un plan d'action continu communautaire pour l'évaluation des substances, en s'en remettant aux autorités compétentes des États membres pour évaluer les substances qu'il comprend. Lorsque l'utilisation d'intermédiaires isolés sur le site crée un risque équivalent au niveau de préoccupation résultant de l'utilisation de substances soumises à autorisation, les autorités compétentes des États membres devraient également être autorisées à exiger des informations complémentaires, si cette demande est justifiée.

- (67) Un accord collectif au sein du comité des États membres de l'Agence au sujet de leurs projets de décisions devrait constituer la base d'un système efficace qui respecte le principe de subsidiarité, tout en préservant le marché intérieur. Si un ou plusieurs États membres, ou l'Agence, contestent un projet de décision, il devrait être adopté selon une procédure centralisée. Faute d'accord unanime au sein du comité des États membres, la Commission devrait adopter une décision conformément à une procédure de comité.
- (68) L'évaluation peut conduire à la conclusion que des mesures devraient être prises dans le cadre des procédures de restriction ou d'autorisation, ou qu'une mesure de gestion des risques devrait être envisagée au titre d'un autre acte législatif approprié. Par conséquent, les informations sur les procédures d'évaluation devraient être rendues publiques.
- (69) Pour assurer un niveau suffisamment élevé de protection de la santé humaine, y compris en ce qui concerne les groupes de population humaine concernés et, éventuellement, certaines sous-populations vulnérables, et de l'environnement, il convient, conformément au principe de précaution, d'accorder une attention particulière aux substances extrêmement préoccupantes. Il convient d'octroyer l'autorisation lorsque les personnes physiques ou morales qui la demandent apportent la preuve à l'autorité octroyant l'autorisation que les risques qu'entraîne l'utilisation de la substance pour la santé humaine ou l'environnement sont valablement maîtrisés. Dans le cas contraire, l'utilisation peut néanmoins être autorisée s'il peut être démontré que les avantages socio-économiques qu'offre l'utilisation de la substance en cause l'emportent sur les risques liés à son utilisation et qu'il n'existe pas de substances ou de technologies de remplacement appropriées qui soient économiquement et techniquement viables. Eu égard à l'impératif de bon fonctionnement du marché intérieur, il convient que la Commission soit l'autorité octroyant les autorisations.

- (70) Il conviendrait d'éviter les effets néfastes sur la santé humaine et l'environnement des substances très préoccupantes en appliquant des mesures de gestion des risques appropriées pour faire en sorte que tout risque lié à l'utilisation d'une substance soit valablement maîtrisé, le but étant de remplacer progressivement ces substances par des substances plus sûres appropriées. Les mesures de gestion des risques devraient être appliquées pour faire en sorte que, lorsque des substances sont fabriquées, mises sur le marché et utilisées, l'exposition à ces substances, notamment celle liée aux rejets, émissions et fuites, tout au long de leur cycle de vie, reste inférieure au seuil sous lequel les effets néfastes ne sont pas susceptibles d'avoir lieu. S'agissant d'une substance pour laquelle l'autorisation a été accordée ou d'une substance pour laquelle il n'est pas possible d'établir un niveau sûr d'exposition, des mesures devraient dans tous les cas être prises pour réduire au minimum, dans la mesure de ce qui est possible techniquement et pratiquement, l'exposition et les émissions, afin de réduire au minimum la possibilité d'effets néfastes. Tout rapport sur la sécurité chimique devrait identifier les mesures permettant d'assurer une maîtrise appropriée. Ces mesures devraient être appliquées et, le cas échéant, recommandées aux autres acteurs de la chaîne d'approvisionnement.
- (71) Des méthodologies visant à fixer des seuils pour les substances cancérogènes et mutagènes peuvent être conçues en tenant compte des résultats des PMR. Il est possible de modifier l'annexe concernée, sur la base de ces méthodologies, afin de permettre, le cas échéant, l'utilisation de seuils tout en assurant un niveau élevé de protection de la santé humaine et de l'environnement.

- (72) Dans l'optique du remplacement à terme des substances extrêmement préoccupantes par d'autres substances et technologies appropriées, tous les demandeurs d'autorisation devraient fournir une analyse des solutions de remplacement examinant les risques qu'elles comportent, ainsi que leur faisabilité technique et économique y compris les informations concernant la recherche et le développement que le demandeur d'autorisation entreprend ou prévoit d'entreprendre. Les autorisations devraient, en outre, être soumises à une période limitée de révision, dont la durée serait déterminée au cas par cas, et devraient normalement être assorties de conditions, y compris un suivi.
- (73) Le remplacement d'une substance telle quelle ou d'une substance contenue dans une préparation ou dans un article devrait être imposé lorsque la fabrication, l'utilisation ou la commercialisation de la substance entraîne un risque inacceptable pour la santé humaine ou pour l'environnement, compte tenu de la disponibilité de substances et de technologies de remplacement plus sûres appropriées ainsi que des avantages socio-économiques de l'utilisation de la substance présentant un risque inacceptable.
- (74) Le remplacement d'une substance extrêmement préoccupante par une substance ou technologie de remplacement plus sûres appropriées devrait être envisagé par toutes les personnes demandant une autorisation d'utilisation de cette substance telle quelle, contenue dans une préparation ou à incorporer dans un article en effectuant une analyse des solutions de remplacement, des risques liés à l'utilisation de la solution de remplacement et de la faisabilité technique et économique du remplacement.
- (75) La possibilité d'introduire des restrictions à la fabrication, à la mise sur le marché et à l'utilisation de substances, de préparations et d'articles dangereux s'applique à toutes les substances relevant du champ d'application du présent règlement, à l'exclusion d'exceptions mineures. Les restrictions à la mise sur le marché et à l'utilisation de substances cancérigènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction, de catégorie 1 ou 2, destinées à être utilisées par les consommateurs telles quelles ou dans des préparations, devrait être maintenue.

- (76) L'expérience acquise au niveau international montre que les substances possédant des caractéristiques qui les rendent persistantes, bioaccumulables et toxiques, ou très persistantes et très bioaccumulables, sont extrêmement préoccupantes, alors que des critères permettant l'identification de ces substances ont été élaborés. Certaines autres substances suscitent des préoccupations suffisamment graves pour que le même régime leur soit appliqué au cas par cas. Les critères énoncés à l'annexe XIII devraient être révisés en tenant compte de l'expérience acquise dans l'identification des substances mentionnées ci-dessus et, le cas échéant, être modifiés afin d'assurer un niveau élevé de protection de la santé humaine et de l'environnement.
- (77) Pour des raisons de faisabilité et de praticabilité, tant du côté des personnes physiques ou morales, qui doivent élaborer les dossiers de demande et prendre des mesures appropriées de gestion des risques, que du côté des autorités, qui doivent traiter les demandes d'autorisation, il convient que seul un nombre limité de substances soit soumis simultanément à la procédure d'autorisation et que des délais réalistes soient fixés pour les demandes, l'exemption de certaines utilisations étant permise. Les substances identifiées comme remplissant les critères d'autorisation devraient figurer sur une liste de substances identifiées en vue d'une éventuelle inclusion dans la procédure d'autorisation. Dans cette liste, les substances relevant du programme de travail de l'Agence devraient être clairement identifiées.
- (78) L'Agence devrait fournir des conseils concernant la détermination des substances prioritaires devant faire l'objet de la procédure d'autorisation, afin d'assurer que les décisions soient conformes aux besoins de la société et qu'elles tiennent compte des connaissances scientifiques et de leur évolution.
- (79) L'interdiction totale d'une substance signifierait qu'aucune de ses utilisations ne peut être autorisée. Il serait, dès lors, inutile de permettre la présentation de demandes d'autorisation. Dans ce cas, la substance devrait être retirée de la liste des substances pour lesquelles des demandes peuvent être introduites et ajoutée à la liste des substances faisant l'objet de restrictions.

- (80) Il convient de veiller à une interaction adéquate entre les dispositions relatives à l'autorisation et aux restrictions afin de préserver le bon fonctionnement du marché intérieur ainsi que la protection de la santé, de la sécurité et de l'environnement. Les restrictions en vigueur lorsque la substance en question est ajoutée à la liste des substances pour lesquelles des demandes d'autorisation peuvent être introduites, devraient être maintenues pour cette substance. Il convient que l'Agence vérifie si le risque que présente l'utilisation de substances dans des articles est valablement maîtrisé et, si tel n'est pas le cas, qu'elle prépare un dossier concernant l'introduction de nouvelles restrictions pour des substances dont l'utilisation nécessite une autorisation.
- (81) En vue d'assurer une approche harmonisée de l'autorisation des utilisations de substances données, l'Agence devrait rendre des avis sur les risques liés à ces utilisations en ce compris lorsque la substance est ou non contrôlée de manière adéquate, ainsi que sur les analyses socio-économiques qui lui seraient présentées par des tiers. Ces avis devraient être pris en compte par la Commission lorsqu'elle décide d'octroyer ou non l'autorisation.
- (82) Pour permettre un suivi et une mise en œuvre efficaces de l'obligation d'autorisation, les utilisateurs en aval bénéficiant d'une autorisation octroyée à leur fournisseur devraient informer l'Agence de l'utilisation qu'ils font de la substance.
- (83) Il convient que les décisions finales d'octroi ou de refus d'autorisation soient adoptées par la Commission conformément à une procédure de réglementation afin de permettre l'examen de toutes leurs implications dans les États membres et d'associer plus étroitement ces derniers aux décisions.

- (84) En vue d'accélérer le fonctionnement du système actuel, la procédure de restriction devrait être restructurée et la directive 76/769/CEE, qui a été modifiée et adaptée, à plusieurs reprises, de façon substantielle, devrait être remplacée. Dans un souci de clarté et comme point de départ de cette nouvelle procédure accélérée de restriction, toutes les restrictions élaborées dans le cadre de ladite directive devraient être incorporées dans le présent règlement. Le cas échéant, l'application de l'annexe XVII du présent règlement devrait être facilitée par des orientations élaborées par la Commission.
- (85) En ce qui concerne l'annexe XVII, les États membres devraient être autorisés à maintenir des restrictions plus strictes pendant une période transitoire de six ans, pour autant que ces restrictions aient été notifiées conformément au traité. Cette disposition devrait s'appliquer aux substances telles quelles, aux substances contenues dans des préparations et à celles contenues dans des articles, dont la fabrication, la mise sur le marché et l'utilisation sont limitées. La Commission devrait établir et publier un inventaire de ces restrictions. Cela fournirait l'occasion à la Commission de réexaminer les mesures concernées en vue d'une éventuelle harmonisation.
- (86) Il devrait être de la responsabilité du fabricant, de l'importateur et de l'utilisateur en aval de déterminer les mesures de gestion des risques qui sont nécessaires pour assurer un niveau élevé de protection de la santé humaine et de l'environnement contre les effets de la fabrication, de la mise sur le marché ou de l'utilisation d'une substance, telle quelle ou contenue dans une préparation ou un article. Toutefois, lorsque cette obligation est jugée insuffisante et que l'adoption d'une législation communautaire est justifiée, des restrictions appropriées devraient être prévues.

- (87) En vue de protéger la santé humaine et l'environnement, les restrictions imposées à la fabrication, à la mise sur le marché ou à l'utilisation d'une substance, telle quelle ou contenue dans une préparation ou un article, peuvent prévoir des conditions dont seront assorties ces opérations, ou l'interdiction de celles-ci. Il est, dès lors, nécessaire d'établir une liste des restrictions nouvelles et des modifications apportées aux restrictions existantes.
- (88) En vue de préparer une proposition de restriction et pour qu'une législation à cet effet puisse être effective, il convient d'assurer une bonne coopération, coordination et information entre les États membres, l'Agence, d'autres organes de la Communauté, la Commission et les parties intéressées.
- (89) Pour pouvoir présenter des propositions visant à prévenir un risque spécifique pour la santé humaine et l'environnement, les États membres devraient élaborer un dossier conformément à des exigences détaillées. Ce dossier devrait justifier la nécessité d'une action à l'échelon communautaire.
- (90) Pour assurer une approche harmonisée en matière de restrictions, l'Agence devrait jouer un rôle de coordinateur de cette procédure, par exemple en désignant les rapporteurs nécessaires et en vérifiant le respect des dispositions des annexes pertinentes. L'Agence devrait tenir à jour une liste des substances pour lesquelles un dossier de restriction est en cours d'élaboration.
- (91) Afin de pouvoir prévenir un risque spécifique pour la santé humaine et l'environnement qui nécessite une action au niveau communautaire, la Commission devrait pouvoir confier à l'Agence le soin d'élaborer un dossier de restriction.

- (92) Pour des raisons de transparence, l'Agence devrait publier le dossier en question, y compris les restrictions proposées, et demander aux parties intéressées de faire connaître leurs observations.
- (93) Pour pouvoir mener la procédure à son terme en temps opportun, l'Agence devrait présenter ses avis concernant la mesure proposée et l'impact de cette mesure sur la base d'un projet d'avis rédigé par un rapporteur.
- (94) Afin d'accélérer le déroulement de la procédure de restriction, il convient que la Commission élabore son projet de modification dans un délai déterminé suivant la réception des avis de l'Agence.
- (95) L'Agence devrait jouer un rôle central en assurant la crédibilité de la législation sur les substances et des processus décisionnels, ainsi que de leurs bases scientifiques, auprès de toutes les parties intéressées et du public. Elle devrait également jouer un rôle décisif dans la coordination des informations communiquées au sujet du présent règlement et dans sa mise en œuvre. Par conséquent, il est essentiel que les institutions communautaires, les États membres, le public et les parties intéressées accordent leur confiance à l'Agence. Pour cette raison, il est capital de garantir l'indépendance de celle-ci, de la doter de capacités scientifiques, techniques et réglementaires élevées et d'assurer la transparence et l'efficacité de son action.
- (96) L'Agence devrait avoir des structures adaptées aux tâches qu'elle est appelée à exécuter. L'expérience faite avec des agences communautaires comparables fournit quelques points de repère à cet égard, mais les structures devraient être adaptées sur la base des besoins spécifiques résultant du présent règlement.
- (97) La communication efficace de l'information sur les risques chimiques et les moyens de gérer ceux-ci est un aspect essentiel du système mis en place par le présent règlement. Il conviendrait de prendre en considération les meilleures pratiques du secteur de la chimie et d'autres secteurs lors de l'élaboration par l'Agence des orientations destinées aux parties concernées.

- (98) Pour des raisons d'efficacité, le personnel du secrétariat de l'Agence devrait essentiellement accomplir des tâches technico-administratives et scientifiques sans faire appel aux ressources scientifiques et techniques des États membres. Le directeur exécutif devrait assurer l'exécution efficace des tâches de l'Agence en toute indépendance. Pour que l'Agence puisse jouer le rôle qui lui est assigné, le conseil d'administration devrait être composé de manière à représenter chaque État membre, la Commission et les autres parties intéressées désignées par la Commission afin d'assurer la participation de ces parties et du Parlement européen, ainsi qu'à assurer le niveau de compétence le plus élevé et à réunir un large éventail de compétences techniques en matière de sécurité chimique ou de réglementation, tout en veillant à l'existence de compétences spécialisées dans le domaine des questions juridiques et des questions financières générales.
- (99) Afin de pouvoir jouer le rôle qui lui est assigné, l'Agence devrait disposer des moyens nécessaires pour s'acquitter de toutes les tâches qui lui sont attribuées.
- (100) Un règlement de la Commission devrait préciser la structure et le montant des redevances, notamment les circonstances dans lesquelles une partie des redevances sera transférée à l'autorité compétente de l'État membre concerné.
- (101) Le conseil d'administration de l'Agence devrait être investi des compétences nécessaires pour établir le budget, en contrôler l'exécution, établir un règlement intérieur, adopter un règlement financier et nommer le directeur exécutif.
- (102) Par l'intermédiaire du comité d'évaluation des risques et du comité d'analyse socio-économique, l'Agence devrait reprendre la mission des comités scientifiques institués auprès de la Commission, en rendant des avis scientifiques dans son domaine de compétence.

- (103) Par l'intermédiaire du comité des États membres, l'Agence devrait s'efforcer de parvenir à un accord entre les autorités des États membres sur des points spécifiques qui exigent une approche harmonisée.
- (104) Il est nécessaire d'assurer une coopération étroite entre l'Agence, d'une part, et les autorités compétentes travaillant dans les États membres, d'autre part, pour que les avis scientifiques du comité d'évaluation des risques et du comité d'analyse socio-économique puissent s'appuyer sur les compétences scientifiques et techniques les plus larges possibles qui existent dans la Communauté. À cette fin, ces comités devraient également pouvoir faire appel à des compétences complémentaires dans des domaines particuliers.
- (105) Compte tenu de la responsabilité croissante des personnes physiques ou morales quant à la sécurité d'utilisation des substances, il est nécessaire de renforcer la mise en œuvre de la législation. L'Agence devrait, par conséquent, comporter un forum pour que les États membres puissent échanger des informations concernant leurs activités liées à la mise en œuvre de la législation sur les substances et coordonner ces activités. Il serait utile que la coopération des États membres dans ce domaine, actuellement informelle, puisse s'exercer dans un cadre plus formel.
- (106) Il y a lieu d'instaurer, au sein de l'Agence, une chambre de recours en vue de garantir le traitement des recours de toute personne physique ou morale touchée par des décisions de l'Agence.

- (107) L'Agence devrait être financée en partie par les redevances des personnes physiques ou morales et en partie par le budget général des Communautés européennes. La procédure budgétaire communautaire devrait rester applicable en ce qui concerne les subventions qui seraient à la charge du budget général des Communautés européennes. En outre, le contrôle des comptes devrait être assuré par la Cour des comptes conformément à l'article 91 du règlement (CE, Euratom) n° 2343/2002 de la Commission du 23 décembre 2002 portant règlement financier-cadre des organismes visés à l'article 185 du règlement (CE, Euratom) n° 1605/2002 du Conseil portant règlement financier applicable au budget général des Communautés européennes . ¹
- (108) Lorsque la Commission et l'Agence le jugent opportun, les représentants de pays tiers devraient avoir la possibilité de participer aux travaux de l'Agence.
- (109) L'Agence devrait contribuer, en coopérant avec des organisations intéressées à l'harmonisation des réglementations internationales, aux efforts déployés par la Communauté et les États membres dans le cadre de ces activités d'harmonisation. Pour favoriser un large consensus international, l'Agence devrait tenir compte des normes internationales existantes et nouvelles dans le cadre de la réglementation des substances, telles que le système mondial harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques.
- (110) L'Agence devrait fournir l'infrastructure dont les personnes physiques et morales ont besoin pour remplir leurs obligations découlant des dispositions relatives au partage des données.

¹ JO L 357 du 31.12.2002, p. 72.

- (111) Il importe d'éviter toute confusion entre les missions de l'Agence et celles de l'Agence européenne des médicaments (AEM), instituée par le règlement (CE) n° 726/2004 du Parlement européen et du Conseil du 31 mars 2004 établissant des procédures communautaires pour l'autorisation et la surveillance en ce qui concerne les médicaments à usage humain et à usage vétérinaire, et instituant une agence européenne des médicaments ¹, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESA), instituée par le règlement (CE) n° 178/2002 du Parlement européen et du Conseil du 28 janvier 2002 établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire, instituant l'Autorité européenne de sécurité des aliments et fixant des procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires ² et du Comité consultatif pour la sécurité, l'hygiène et la protection de la santé sur le lieu de travail, institué par la décision du 22 juillet 2003 du Conseil ³. En conséquence, l'Agence devrait adopter un règlement intérieur qui rende nécessaire une coopération avec l'AESA ou avec le comité consultatif pour la sécurité, l'hygiène et la protection de la santé sur le lieu de travail. Le présent règlement devrait être, par ailleurs, sans préjudice des compétences conférées par la législation communautaire à l'AEM, à l'AESA et au comité consultatif pour la sécurité, l'hygiène et la protection de la santé sur le lieu de travail.
- (112) Afin d'assurer le bon fonctionnement du marché intérieur des substances, telles quelles ou contenues dans des préparations, tout en assurant dans le même temps un niveau élevé de protection de la santé humaine et de l'environnement, il convient d'établir des règles en vue de la mise en place d'un inventaire des classifications et des étiquetages.
- (113) Il y a lieu, dès lors, que la classification et l'étiquetage de toute substance qui fait l'objet d'enregistrements ou qui entre dans le champ d'application de l'article 1^{er} de la directive 67/548/CEE et qui est mise sur le marché, soient notifiés à l'Agence afin de les inclure dans l'inventaire.

¹ JO L 136 du 30.4.2004, p. 1.

² JO L 31 du 1.2.2002, p. 1. Règlement modifié par le règlement (CE) n° 1642/2003 (JO L 245 du 29.9.2003, p. 4).

³ JO L 218 du 13.9.2003, p. 1.

- (114) Afin d'assurer une protection harmonisée du public, en particulier des personnes qui entrent en contact avec certaines substances, et le bon fonctionnement d'autres législations communautaires reposant sur la classification et l'étiquetage, il convient de consigner dans un inventaire la classification, faite conformément à la directive 67/548/CEE et à la directive 1999/45/CE, convenue par les fabricants et les importateurs d'une même substance, si possible, ainsi que les décisions prises à l'échelon communautaire en vue d'harmoniser la classification et l'étiquetage de certaines substances. Pour ce faire, il convient de tenir pleinement compte des travaux réalisés et de l'expérience acquise au regard des activités relevant de la directive 67/548/CEE, y compris la classification et l'étiquetage des substances ou groupes de substances énumérés à l'annexe I de directive 67/548/CEE.
- (115) Les ressources devraient être ciblées sur les substances les plus préoccupantes. Des substances devraient donc être ajoutées à l'annexe I de la directive 67/548/CEE lorsqu'elles répondent aux critères de classification des substances comme cancérogènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction, de catégories 1, 2 ou 3, comme allergènes respiratoires ou, en ce qui concerne d'autres effets, au cas par cas. Il convient de prévoir des dispositions permettant aux autorités compétentes de soumettre des propositions à l'Agence. Celle-ci devrait rendre son avis sur la proposition, tandis que les parties intéressées devraient avoir la possibilité de faire connaître leurs observations. La Commission devrait ensuite prendre une décision.
- (116) Des rapports réguliers des États membres et de l'Agence portant sur le fonctionnement du présent règlement constitueront un moyen indispensable pour en suivre l'application, ainsi que l'évolution dans ce domaine. Les conclusions tirées des constatations énoncées dans les rapports constitueront des outils précieux et pratiques lors de la révision du présent règlement et, le cas échéant, lors de l'élaboration de propositions de modifications.

- (117) Les citoyens de l'Union européenne devraient avoir accès à des informations sur les substances auxquelles ils risquent d'être exposés, afin de pouvoir prendre, en connaissance de cause, des décisions sur l'utilisation qu'ils souhaitent faire de ces substances. Un moyen transparent de réaliser cet objectif consiste à assurer aux citoyens un accès gratuit et aisé aux données de base contenues dans la base de données de l'Agence, y compris des descriptions succinctes de propriétés dangereuses, les exigences en matière d'étiquetage et la législation communautaire pertinente, notamment les utilisations autorisées et les mesures de gestion des risques. Il convient que l'Agence et les États membres permettent l'accès à l'information conformément à la directive 2003/4/CE du Parlement européen et du Conseil du 28 janvier 2003 concernant l'accès du public à l'information en matière d'environnement ¹, au règlement (CE) n° 1049/2001 du Parlement européen et du Conseil du 30 mai 2001 relatif à l'accès du public aux documents du Parlement européen, du Conseil et de la Commission, ² et à la convention de la CEE-ONU sur l'accès à l'information, la participation du public au processus décisionnel et l'accès à la justice en matière d'environnement, à laquelle la Communauté européenne est partie.
- (118) La divulgation d'informations au titre du présent règlement est soumise aux prescriptions du règlement (CE) n° 1049/2001. Ce dernier prévoit des délais contraignants pour la communication d'informations, ainsi que des garanties procédurales, notamment le droit de recours. Le conseil d'administration devrait adopter, à l'intention de l'Agence, les modalités pratiques d'application de ces prescriptions.

¹ JO L 41 du 14.02.2003, p. 26.

² JO L 145 du 31.05.2001, p. 43.

- (119) Outre leur participation à la mise en œuvre de la législation communautaire, les autorités compétentes des États membres devraient, en raison de leur proximité vis-à-vis des parties intéressées dans les États membres, jouer un rôle dans l'échange d'informations sur les risques liés aux substances et sur les obligations que la législation sur les substances impose aux personnes physiques ou morales. Parallèlement, une coopération étroite entre l'Agence, la Commission et les autorités compétentes des États membres est nécessaire pour assurer la cohérence et l'efficacité du processus global de communication.
- (120) Pour que le système établi par le présent règlement puisse fonctionner de manière efficace, la coopération, la coordination et l'échange d'informations entre les États membres, l'Agence et la Commission en matière d'exécution devraient être de qualité.
- (121) Afin d'assurer le respect du présent règlement, les États membres devraient mettre en place des mesures efficaces de suivi et de contrôle. Les inspections nécessaires devraient être programmées et réalisées, et leurs résultats devraient être consignés dans des rapports.
- (122) Pour que la transparence, l'impartialité et la cohérence du niveau des mesures d'exécution des États membres soient assurées, il est nécessaire que les États membres mettent en place un système de sanctions approprié en vue d'imposer des sanctions effectives, proportionnées et dissuasives aux opérateurs qui ne respectent pas le présent règlement, car toute violation de celui-ci peut avoir des effets nocifs pour la santé humaine et l'environnement.

- (123) Il y a lieu d'arrêter les mesures nécessaires pour la mise en œuvre du présent règlement, ainsi que certaines modifications devant lui être apportées, en conformité avec la décision 1999/468/CE du Conseil du 28 juin 1999 fixant les modalités de l'exercice des compétences d'exécution conférées à la Commission . ¹
- (124) Il convient, en particulier, d'habiliter la Commission à modifier les annexes dans certains cas, à fixer des règles concernant les méthodes d'essai, à modifier le pourcentage de dossiers sélectionnés pour effectuer le contrôle de conformité et à modifier les critères de sélection desdits dossiers, et à déterminer les critères permettant de définir ce qui constitue une justification suffisante de l'impossibilité technique d'un essai. Ces mesures ayant une portée générale et ayant pour objet de modifier des aspects non essentiels du présent règlement ou de compléter le présent règlement par l'ajout de nouveaux éléments non essentiels, elles doivent être arrêtées selon la procédure de réglementation avec contrôle visée à l'article 5 bis de la décision 1999/468/CE.
- (125) Il est essentiel que les substances soient réglementées de manière efficace et en temps voulu dans l'attente de la pleine applicabilité des dispositions du présent règlement, notamment durant la période de démarrage de l'Agence. Il convient, dès lors, de prévoir que la Commission apporte le soutien nécessaire en vue de la création de l'Agence, y compris en concluant des contrats et en nommant un directeur exécutif par intérim en attendant que le conseil d'administration de l'Agence puisse nommer lui-même un directeur exécutif.

¹ JO L 184 du 17.7.1999, p. 23. Décision modifiée par la décision 2006/512/CE (JO L 200 du 22.7.2006, p. 11).

- (126) Pour tirer pleinement parti des travaux réalisés au titre du règlement (CEE) n° 793/93 ainsi qu'au titre de la directive 76/769/CEE, et pour éviter qu'ils soient perdus, la Commission devrait pouvoir, au cours de la période de démarrage, imposer des restrictions sur la base des travaux déjà exécutés, sans suivre intégralement la procédure de restriction prévue par le présent règlement. Tous ces éléments devraient être utilisés, dès que le présent règlement entre en vigueur, pour appuyer les mesures de réduction des risques.
- (127) Il convient que les dispositions du présent règlement entrent en vigueur par étapes afin d'assurer une transition harmonieuse vers le nouveau système. En outre, une entrée en vigueur progressive des dispositions devrait permettre à toutes les parties concernées, aux autorités, aux personnes physiques ou morales et aux parties prenantes de concentrer leurs ressources sur les préparatifs qui doivent leur permettre d'assumer leurs nouvelles tâches en temps opportun.
- (128) Le présent règlement remplace la directive 76/769/CEE, la directive 91/155/CEE de la Commission, ¹la directive 93/67/CEE de la Commission, la directive 93/105/CE de la Commission, ³la directive 2000/21/CE de la Commission, le règlement (CEE) n° 793/93 du Conseil et le règlement (CE) n° 1488/94 de la Commission. ⁵

¹ Directive 91/155/CEE de la Commission du 5 mars 1991 définissant et fixant, en application de l'article 10 de la directive 88/379/CEE du Conseil, les modalités du système d'information spécifique relatif aux préparations dangereuses (JO L 76 du 22.3.1991, p. 35). Directive modifiée en dernier lieu par la directive 2001/58/CE (JO L 212 du 7.8.2001, p. 24).

² Directive 93/67/CEE de la Commission du 20 juillet 1993 établissant les principes d'évaluation des risques pour l'homme et pour l'environnement des substances notifiées conformément à la directive 67/548/CEE du Conseil (JO L 227 du 8.9.1993, p. 9).

³ Directive 93/105/CE de la Commission du 25 novembre 1993 établissant l'annexe VII D contenant les informations requises pour les dossiers techniques visés à l'article 12 de la directive portant septième modification de la directive 67/548/CEE du Conseil (JO L 294 du 30.11.1993, p. 21).

⁴ Directive 2000/21/CE de la Commission du 25 avril 2000 concernant la liste des actes communautaires visée à l'article 13, paragraphe 1, cinquième tiret, de la directive 67/548/CEE du Conseil (JO L 103 du 28.4.2000, p. 70).

⁵ Règlement (CE) n° 1488/94 de la Commission du 28 juin 1994 établissant les principes d'évaluation des risques pour l'homme et pour l'environnement présentés par les substances existantes conformément au règlement (CEE) n° 793/93 du Conseil (JO L 161 du 29.6.1994, p. 3).

- (129) Pour des raisons de cohérence, il y a lieu de modifier la directive 1999/45/CE qui porte déjà sur des matières couvertes par le présent règlement.
- (130) Étant donné que les objectifs du présent règlement, à savoir d'arrêter des règles applicables aux substances et d'instituer une agence européenne des produits chimiques, ne peuvent pas être réalisés de manière suffisante par les États membres et peuvent donc être mieux réalisés au niveau communautaire, la Communauté peut prendre des mesures, conformément au principe de subsidiarité consacré à l'article 5 du traité. Conformément au principe de proportionnalité tel qu'énoncé audit article, le présent règlement n'excède pas ce qui est nécessaire pour atteindre ces objectifs.
- (131) Le présent règlement respecte les droits et principes fondamentaux qui sont reconnus notamment par la Charte des droits fondamentaux de l'Union européenne . En particulier, il s'efforce d'assurer le plein respect des principes de protection de l'environnement et de développement durable, garanti par l'article 37 de ladite Charte,

ONT ARRÊTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT:

¹ JO C 364 du 18.12.2000, p. 1.

TABLE DES MATIÈRES

TITRE I	GÉNÉRALITÉS
Chapitre 1	Objet, champ d'application et application
Chapitre 2	Définitions et dispositions générales
TITRE II	ENREGISTREMENT DES SUBSTANCES
Chapitre 1	Obligation générale d'enregistrement et exigences en matière d'informations
Chapitre 2	Substances considérées comme étant enregistrée
Chapitre 3	Obligation d'enregistrement et exigences en matière d'informations concernant certains types d'intermédiaires isolés
Chapitre 4	Dispositions communes applicables à l'ensemble des enregistrements
Chapitre 5	Dispositions transitoires applicables aux substances bénéficiant d'un régime transitoire et aux substances notifiées

TITRE III	ÉCHANGE DES DONNÉES ET PRÉVENTION DES ESSAIS INUTILES
Chapitre 1	Objectifs et règles générales
Chapitre 2	Règles applicables aux substances ne bénéficiant pas d'un régime transitoire et aux déclarants de substances bénéficiant d'un régime transitoire qui n'ont pas effectué d'enregistrement préalable
Chapitre 3	Règles applicables aux substances bénéficiant d'un régime transitoire
TITRE IV	INFORMATION À L'INTÉRIEUR DE LA CHAÎNE D'APPROVISIONNEMENT
TITRE V	UTILISATEURS EN AVAL
TITRE VI	ÉVALUATION DES SUBSTANCES
Chapitre 1	Évaluation des dossiers
Chapitre 2	Évaluation des substances
Chapitre 3	Évaluation des intermédiaires
Chapitre 4	Dispositions communes

TITRE VII	AUTORISATION
Chapitre 1	Obligation d'autorisation
Chapitre 2	Octroi des autorisations
Chapitre 3	Autorisations dans la chaîne d'approvisionnement
TITRE VIII	RESTRICTIONS APPLICABLES À LA FABRICATION, À LA MISE SUR LE MARCHÉ ET À L'UTILISATION DE CERTAINES SUBSTANCES ET PRÉPARATIONS DANGEREUSES
Chapitre 1	Généralités
Chapitre 2	La procédure de restriction
TITRE IX	REDEVANCES ET DROITS
TITRE X	L'AGENCE
TITRE XI	INVENTAIRE DES CLASSIFICATIONS ET DES ÉTIQUETAGES
TITRE XII	INFORMATIONS
TITRE XIII	AUTORITÉS COMPÉTENTES
TITRE XIV	EXÉCUTION
TITRE XV	DISPOSITIONS TRANSITOIRES ET FINALES

ANNEXE I	DISPOSITIONS GÉNÉRALES AFFÉRENTES À L'ÉVALUATION DES SUBSTANCES ET À L'ÉLABORATION DES RAPPORTS SUR LA SÉCURITÉ CHIMIQUE
ANNEXE II	GUIDE D'ÉLABORATION DES FICHES DE DONNÉES DE SÉCURITÉ
ANNEXE III	CRITÈRES POUR LES SUBSTANCES ENREGISTRÉES EN QUANTITÉS COMPRISES ENTRE 1 ET 10 TONNES
ANNEXE IV	EXEMPTIONS DE L'OBLIGATION D'ENREGISTREMENT CONFORMÉMENT À L'ARTICLE 2, PARAGRAPHE 7, POINT A)
ANNEXE V	EXEMPTIONS DE L'OBLIGATION D'ENREGISTREMENT CONFORMÉMENT À L'ARTICLE 2, PARAGRAPHE 7, POINT B)
ANNEXE VI	EXIGENCES EN MATIÈRE D'INFORMATION VISÉES À L'ARTICLE 10
ANNEXE VII	EXIGENCES EN MATIÈRE D'INFORMATIONS STANDARD POUR LES SUBSTANCES FABRIQUÉES OU IMPORTÉES EN QUANTITÉS ÉGALES OU SUPÉRIEURES À UNE TONNE

ANNEXE VIII	EXIGENCES EN MATIÈRE D'INFORMATIONS STANDARD POUR LES SUBSTANCES FABRIQUÉES OU IMPORTÉES EN QUANTITÉS ÉGALES OU SUPÉRIEURES À 10 TONNES
ANNEXE IX	EXIGENCES EN MATIÈRE D'INFORMATIONS STANDARD POUR LES SUBSTANCES FABRIQUÉES OU IMPORTÉES EN QUANTITÉS ÉGALES OU SUPÉRIEURES À 100 TONNES
ANNEXE X	EXIGENCES EN MATIÈRE D'INFORMATIONS STANDARD POUR LES SUBSTANCES FABRIQUÉES OU IMPORTÉES EN QUANTITÉS ÉGALES OU SUPÉRIEURES À 1000 TONNES
ANNEXE XI	RÈGLES GÉNÉRALES D'ADAPTATION DU RÉGIME D'ESSAIS STANDARD VISÉ AUX ANNEXES VII À X
ANNEXE XII	DISPOSITIONS GÉNÉRALES À APPLIQUER PAR LES UTILISATEURS EN AVAL LORS DE L'ÉVALUATION DES SUBSTANCES ET DE L'ÉLABORATION DES RAPPORTS SUR LA SÉCURITÉ CHIMIQUE

ANNEXE XIII	CRITÈRES D'IDENTIFICATION DES SUBSTANCES PERSISTANTES, BIOACCUMULABLES ET TOXIQUES, ET DES SUBSTANCES TRÈS PERSISTANTES ET TRÈS BIOACCUMULABLES
ANNEXE XIV	LISTE DES SUBSTANCES SOUMISES À AUTORISATION
ANNEXE XV	DOSSIERS
ANNEXE XVI	ANALYSE SOCIO-ÉCONOMIQUE
ANNEXE XVII	RESTRICTIONS APPLICABLES À LA FABRICATION, LA MISE SUR LE MARCHÉ ET L'UTILISATION DE CERTAINES SUBSTANCES ET PRÉPARATIONS DANGEREUSES ET DE CERTAINS ARTICLES DANGEREUX

ANNEXE IX**EXIGENCES EN MATIÈRE D'INFORMATIONS STANDARD
POUR LES SUBSTANCES FABRIQUÉES OU IMPORTÉES EN QUANTITÉS ÉGALES
OU SUPÉRIEURES À 100 TONNES ¹**

Au niveau visé par la présente annexe, le déclarant est tenu de présenter une proposition et un calendrier pour se conformer aux exigences en matière d'informations visées dans la présente annexe, conformément à l'article 12, paragraphe 1, point d).

La colonne 1 de la présente annexe indique les informations standard qui doivent être fournies pour toutes les substances fabriquées ou importées en quantités égales ou supérieures à cent tonnes, conformément à l'article 12, paragraphe 1, point d). En conséquence, les informations exigées à la colonne 1 de la présente annexe viennent s'ajouter à celles qui sont exigées à la colonne 1 des annexes VII et VIII. Il y a lieu de fournir toute autre information disponible pertinente d'ordre physicochimique, toxicologique et écotoxicologique. La colonne 2 énumère les règles spécifiques selon lesquelles le déclarant peut proposer d'omettre les informations standard, les remplacer par d'autres informations, les fournir à un stade différent ou les adapter d'une autre manière. Si les conditions auxquelles la colonne 2 de la présente annexe subordonne les propositions d'adaptations sont remplies, le déclarant en fait clairement état et précise les raisons de chaque proposition d'adaptation sous les rubriques appropriées du dossier d'enregistrement.

Outre ces dispositions spécifiques, un déclarant peut proposer d'adapter les informations standard exigées, mentionnées à la colonne 1 de la présente annexe, selon les dispositions générales énoncées à l'annexe XI. Dans ce cas également, il indique clairement les raisons de toute décision de proposer des adaptations aux informations standard sous les rubriques appropriées dans le dossier d'enregistrement en se référant aux règles spécifiques appropriées de la colonne 2 ou de l'annexe XI.²

¹ La présente annexe s'applique aux producteurs d'articles qui, en vertu de l'article 7, sont tenus de demander l'enregistrement et, mutatis mutandis, aux autres utilisateurs en aval qui sont tenus de procéder à des essais par le présent règlement.

² Note: les conditions dans lesquelles un essai spécifique n'est pas exigé qui sont fixées dans les méthodes d'essai appropriées dans le règlement de la Commission concernant les méthodes d'essai, tel que spécifié à l'article 13, paragraphe 3, qui ne sont pas répétées dans la colonne 2, s'appliquent également.

Avant la réalisation de nouveaux essais pour déterminer les propriétés mentionnées dans la présente annexe, l'ensemble des données in vitro, des données in vivo, des données humaines historiques, des données R(Q)SA valides et des données de substances structurellement apparentées (par référence croisée) qui sont disponibles sont d'abord évaluées. Il y a lieu d'éviter les essais in vivo qui utilisent des substances corrosives à des niveaux de concentration/dose qui entraînent la corrosivité. Avant les essais, il y a lieu de consulter, outre la présente annexe, d'autres guides sur les stratégies d'essais.

S'il est proposé de ne pas fournir d'informations concernant certains effets pour des raisons autres que celles visées à la colonne 2 de la présente annexe ou à l'annexe XI, il y a également lieu d'en faire clairement état et d'en préciser les raisons.

7. INFORMATIONS SUR LES PROPRIÉTÉS PHYSICOCHIMIQUES DE LA SUBSTANCE

COLONNE 1 INFORMATIONS STANDARD EXIGÉES	COLONNE 2 RÈGLES SPÉCIFIQUES APPLICABLES AUX ADAPTATIONS PAR RAPPORT À LA COLONNE 1
7.15. Stabilité dans les solvants organiques et identité des produits de dégradation à prendre en considération Nécessaire uniquement si la stabilité de la substance est jugée critique.	7.15. L'étude ne doit pas être réalisée si la substance est inorganique.
7.16. Constante de dissociation	7.16. L'étude ne doit pas être réalisée: - si la substance est hydrolytiquement instable (demi-vie inférieure à douze heures) ou si elle est facilement oxydable dans l'eau; ou - s'il est scientifiquement impossible de réaliser l'essai par exemple si la méthode analytique n'est pas assez sensible.
7.17. Viscosité	

8. INFORMATIONS TOXICOLOGIQUES

COLONNE 1 INFORMATIONS STANDARD EXIGÉES	COLONNE 2 RÈGLES SPÉCIFIQUES APPLICABLES AUX ADAPTATIONS PAR RAPPORT À LA COLONNE 1
8.6. Toxicité par administration répétée	8.4. Si une étude de géotoxicité in vitro prévue aux annexes VII ou VIII donne un résultat positif et si aucun résultat d'une étude in vivo n'est déjà disponible, le déclarant propose une étude de géotoxicité citée de cellules somatiques in vivo appropriée. Si une étude sur cellules somatiques in vivo disponible donne un résultat positif, il y a lieu d'envisager le potentiel de mutagenicité sur cellules germinales en se fondant sur toutes les données disponibles, y compris les preuves toxicocinétiques. Si aucune conclusion claire ne peut être tirée quant à la mutagenicité sur cellules germinales, d'autres recherches sont envisagées.
8.6.1. Étude de toxicité par administration répétée à court terme (28 jours), une seule espèce, mâle et femelle, voie d'administration la plus appropriée, compte tenu de la voie probable de l'exposition humaine, sauf si ces données sont déjà fournies en vertu des prescriptions de l'annexe VIII ou si des essais sont proposés conformément au point 8.6.2 de la présente annexe. Dans ce cas, la section 3 de l'annexe XI n'est pas applicable.	

COLONNE 1 INFORMATIONS STANDARD EXIGÉES	COLONNE 2 RÈGLES SPÉCIFIQUES APPLICABLES AUX ADAPTATIONS PAR RAPPORT À LA COLONNE 1
<p>8.6.2. Étude de toxicité subchronique (90 jours), une seule espèce, rongeur, mâle et femelle, voie d'administration la plus appropriée, compte tenu de la voie probable de l'exposition humaine.</p>	<p>8.6.2. L'étude de toxicité à court terme (90 jours) ne doit pas être réalisée:</p> <ul style="list-style-type: none"> - si une étude fiable de toxicité à court terme (28 jours) est disponible, montrant qu'il existe des effets de toxicité graves selon les critères de classification de la substance comm e R48, pour lesquels le noel-28 jours observé, avec application d'un facteur d'incertitude approprié, permet une extrapolation au noel-90 jours pour la même voie d'exposition ; ou - si une étude fiable de toxicité chronique est disponible, à condition qu'une espèce et une voie d'administration appropriées aient été utilisées ; ou - si une substance subit une désintégration immédiate et s'il existe des données suffisantes sur les produits de dissociation (tant pour les effets systémiques que les effets sur le lieu d'absorption); ou - si la substance est non réactive, insoluble et non inhalable et si un "essai limite" de 28 jours n'apporte aucune preuve d'absorption, ni de toxicité, notamment si cette situation est couplée avec une exposition humaine limitée.

COLONNE 1 INFORMATIONS STANDARD EXIGÉES	COLONNE 2 RÈGLES SPÉCIFIQUES APPLICABLES AUX ADAPTATIONS PAR RAPPORT À LA COLONNE 1
	<p>La voie d'administration appropriée est choisie sur la base des éléments ci-après.</p> <p>Les essais par voie cutanée sont appropriés:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) si un contact cutané lors de la production et/ou de l'utilisation est probable; et 2) si les propriétés physicochimiques donnent à penser que le taux d'absorption cutanée est important; et
	<ol style="list-style-type: none"> 3) si l'une des conditions suivantes est remplie: <ul style="list-style-type: none"> - lors de l'essai de toxicité cutanée aiguë, la toxicité est observée à des doses moins élevées que lors de l'essai de toxicité orale; ou - des effets systémiques ou d'autres preuves d'absorption sont observés lors d'études d'irritation de la peau et/ou des yeux; ou - des essais in vitro font apparaître une absorption cutanée importante; ou - une toxicité cutanée ou une pénétration cutanée importante est constatée pour des substances structurellement liées.

COLONNE 1 INFORMATIONS STANDARD EXIGÉES	COLONNE 2 RÈGLES SPÉCIFIQUES APPLICABLES AUX ADAPTATIONS PAR RAPPORT À LA COLONNE 1
	<p>Les essais par inhalation sont appropriés:</p> <p>si l'exposition d'êtres humains par inhalation est probable, compte tenu de la pression de vapeur de la substance et/ou de la possibilité d'exposition à des aérosols, des particules ou des gouttelettes de taille inhalable.</p>

COLONNE 1 INFORMATIONS STANDARD EXIGÉES	COLONNE 2 RÈGLES SPÉCIFIQUES APPLICABLES AUX ADAPTATIONS PAR RAPPORT À LA COLONNE 1
	<p>Des études supplémentaires sont proposées par le déclarant ou peuvent être exigées par l'Agence conformément aux articles 40 ou 41 dans les cas suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> - non-identification d'un NOAEL dans l'étude de 90 jours, sauf si la raison de cette non-identification réside dans l'absence d'effets toxiques nocifs; ou - toxicité particulièrement préoccupante (par exemple: effets sérieux/graves); ou - indication de l'existence d'un effet dont les éléments disponibles ne permettent pas la caractérisation toxicologique et/ou la caractérisation des risques. Dans ces cas-là, il peut également être plus approprié de réaliser des études toxicologiques spécifiques en vue d'étudier l'effet en cause (par exemple, immunotoxicité, neurotoxicité); ou - préoccupations particulières concernant l'exposition (par exemple: utilisation dans des produits de consommation entrant dans des niveaux d'exposition proches des niveaux de dose auxquels on peut s'attendre à une toxicité pour l'humain).

COLONNE 1 INFORMATIONS STANDARD EXIGÉES	COLONNE 2 RÈGLES SPÉCIFIQUES APPLICABLES AUX ADAPTATIONS PAR RAPPORT À LA COLONNE 1
8.7. Toxicité pour la reproduction	<p>8.7. Les études ne doivent pas être réalisées:</p> <ul style="list-style-type: none"> - s'il est avéré que la substance est un cancérigène génotoxique et que des mesures appropriées de gestion des risques sont mises en œuvre; ou - s'il est avéré que la substance est un mutagène sur cellules germinales et que des mesures appropriées de gestion des risques sont mises en œuvre; ou
	<ul style="list-style-type: none"> - si la substance a une faible activité toxicologique (si aucun des tests disponibles n'a fourni de preuve de toxicité), si des données toxicocinétiques permettent de prouver qu'aucune absorption systémique ne se produit par les voies d'exposition prises en considération (par exemple: concentrations plasmatiques inférieures à la limite de détection en cas d'utilisation d'une méthode sensible, et absence de la substance et de métabolites de la substance dans l'urine, la bile ou l'air exhalé), et s'il n'y a pas d'exposition humaine ou pas d'exposition humaine importante.

COLONNE 1 INFORMATIONS STANDARD EXIGÉES	COLONNE 2 RÈGLES SPÉCIFIQUES APPLICABLES AUX ADAPTATIONS PAR RAPPORT À LA COLONNE 1
8.7.2. Étude de toxicité sur le développement prénatal, une espèce, voie d'administration la plus appropriée, compte tenu de la voie probable de l'exposition humaine (B. 31 du règlement de la Commission concernant les méthodes d'essai, tel que spécifié à l'article 13, paragraphe 3, ou OCDE 414).	<p>Si une substance est connue pour avoir des effets néfastes sur la fertilité, répond aux critères de classification des catégories 1 ou 2 pour la classe R60, et que les données disponibles conviennent à une évaluation robuste des risques, il ne sera pas nécessaire de procéder à d'autres essais en matière de fertilité. Il faudra, toutefois, envisager des essais portant sur la toxicité sur le développement.</p> <p>Si une substance est connue pour être à l'origine de toxicité sur le développement, répond aux critères de classification des catégories 1 ou 2 pour la classe R61, et que les données disponibles conviennent à une évaluation robuste des risques, il ne sera pas nécessaire de procéder à d'autres essais en matière de toxicité sur le développement. Il faudra, toutefois, envisager des essais concernant les effets sur la fertilité.</p>
8.7.3. Étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations, une seule espèce, mâle et femelle, voie d'administration la plus appropriée, compte tenu de la voie probable de l'exposition humaine, si l'étude de 28 jours ou de 90 jours fait apparaître des effets nocifs sur les organes ou les tissus reproductifs.	8.7.2 L'étude est effectuée initialement sur une espèce. En fonction du résultat du premier essai et de toutes les autres données pertinentes disponibles, il peut être décidé d'effectuer une étude sur une deuxième espèce à ce niveau de quantité ou au suivant.
8.7.3. Étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations, une seule espèce, mâle et femelle, voie d'administration la plus appropriée, compte tenu de la voie probable de l'exposition humaine, si l'étude de 28 jours ou de 90 jours fait apparaître des effets nocifs sur les organes ou les tissus reproductifs.	8.7.3 L'étude est effectuée initialement sur une espèce. En fonction du résultat du premier essai à ce niveau de quantité ou le suivant, il peut être décidé d'effectuer une étude sur une deuxième espèce à ce niveau de quantité ou le suivant.

9. INFORMATIONS ÉCOTOXICOLOGIQUES

COLONNE 1 INFORMATIONS STANDARD EXIGÉES	COLONNE 2 RÈGLES SPÉCIFIQUES APPLICABLES AUX ADAPTATIONS PAR RAPPORT À LA COLONNE 1
<p>9.1. Toxicité aquatique</p> <p>9.1.5. Essais de toxicité à long terme sur invertébrés (espèce préférentielle daphnies) (sauf si ces données sont déjà fournies en vertu des prescriptions de l'annexe VII)</p> <p>9.1.6. Essais de toxicité à long terme sur des poissons (sauf si ces données ont déjà été fournies en vertu des prescriptions de l'annexe VIII)</p> <p>Les informations sont fournies pour l'un des points suivants: 9.1.6.1, 9.1.6.2 ou 9.1.6.3.</p>	<p>9.1. Des essais de toxicité à long terme sont proposés par le déclarant si l'évaluation de la sécurité chimique, effectuée conformément à l'annexe I, indique qu'il est nécessaire d'approfondir l'étude des effets sur les organismes aquatiques. Le choix du ou des essais appropriés est fonction des résultats de l'évaluation chimique.</p>
<p>9.1.6.1 Essais de toxicité sur des poissons aux premiers stades de leur vie (FELS)</p> <p>9.1.6.2 Essai de toxicité à court terme sur des poissons aux stades de l'embryon et de l'alevin</p> <p>9.1.6.3 Poissons, essai sur la croissance des juvéniles</p>	

COLONNE 1 INFORMATIONS STANDARD EXIGÉES	COLONNE 2 RÈGLES SPÉCIFIQUES APPLICABLES AUX ADAPTATIONS PAR RAPPORT À LA COLONNE 1
<p>9.2. Dégradation</p> <p>9.2.1. Biotique</p> <p>9.2.1.2. Essais de simulation sur la dégradation ultime dans les eaux de surface.</p>	<p>9.2. Des essais de dégradation biotique supplémentaires sont proposés par le déclarant avant si l'évaluation de la sécurité chimique, effectuée conformément à l'annexe I, fait apparaître la nécessité d'approfondir l'étude de la dégradation de la substance et ses produits de dégradation. Le choix du ou des essais appropriés est fonction des résultats de l'évaluation de la sécurité chimique et peut inclure des essais de simulation dans des milieux appropriés (eau, sédiments ou sol, par exemple).</p> <p>9.2.1.2. L'étude ne doit pas être réalisée:</p> <ul style="list-style-type: none"> - si les substances sont fortement insolubles dans l'eau; ou - si la substance est facilement biodégradable.

COLONNE 1 INFORMATIONS STANDARD EXIGÉES	COLONNE 2 RÈGLES SPÉCIFIQUES APPLICABLES AUX ADAPTATIONS PAR RAPPORT À LA COLONNE 1
9.2.1.3. Essais de simulation dans le sol (pour les substances ayant un fort potentiel d'adsorption sur le sol).	9.2.1.3. L'étude ne doit pas être réalisée: - si la substance est facilement biodégradable; ou - si une exposition directe ou indirecte du sol est peu probable.
9.2.1.4. Essais de simulation dans les sédiments (pour les substances ayant un fort potentiel d'adsorption sur les sédiments).	9.2.1.4. L'étude ne doit pas être réalisée: - si la substance est facilement biodégradable; ou - si une exposition directe ou indirecte des sédiments est peu probable.
9.2.3. Identification des produits de dégradation	9.2.3. Sauf si la substance est facilement biodégradable

COLONNE 1 INFORMATIONS STANDARD EXIGÉES	COLONNE 2 RÈGLES SPÉCIFIQUES APPLICABLES AUX ADAPTATIONS PAR RAPPORT A LA COLONNE 1
<p>9.3. Devenir et comportement dans l'environnement</p> <p>9.3.2. Bioaccumulation dans une espèce aquatique, de préférence un poisson</p> <p>9.3.3. Informations supplémentaires sur l'adsorption/désorption, en fonction des résultats de l'étude prescrite à l'annexe VIII</p>	<p>9.3.2. L'étude ne doit pas être réalisée:</p> <ul style="list-style-type: none"> - si la substance a un faible potentiel de bioaccumulation (par exemple $\log K_{ow} < 3$) et/ou un faible potentiel de traversée des membranes biologiques; ou - si une exposition directe ou indirecte du milieu aquatique est peu probable. <p>9.3.3. L'étude ne doit pas être réalisée:</p> <ul style="list-style-type: none"> - si, sur la base des propriétés physicochimiques, on peut s'attendre à ce que la substance possède un faible potentiel d'adsorption (par exemple parce que la substance présente un faible coefficient de partage octanol/eau); ou - si la substance et ses produits de dégradation se décomposent rapidement.

COLONNE 1 INFORMATIONS STANDARD EXIGÉES	COLONNE 2 RÈGLES SPÉCIFIQUES APPLICABLES AUX ADAPTATIONS PAR RAPPORT À LA COLONNE 1
<p>9.4. Effets sur les organismes terrestres</p> <p>9.4.1. Toxicité à court terme pour les invertébrés</p> <p>9.4.2. Effets sur les micro-organismes du sol</p> <p>9.4.3. Toxicité à court terme pour les plantes</p>	<p>9.4. Ces études ne doivent pas être réalisées si une exposition directe et indirecte du milieu terrestre est peu probable.</p> <p>En l'absence de données de toxicité concernant les organismes terrestres, la méthode du coefficient de partage à l'équilibre peut être appliquée pour évaluer l'exposition aux organismes terrestres. Le choix des essais appropriés est fonction des résultats de l'évaluation de la sécurité chimique.</p> <p>En particulier pour les substances qui ont un potentiel élevé d'adsorption sur le sol ou qui sont très persistantes, le déclarant considère la réalisation d'essais de toxicité à long terme, et non à court terme.</p>

10. MÉTHODES DE DÉTECTION ET D'ANALYSE

Une description des méthodes d'analyse est fournie sur demande pour les milieux ayant fait l'objet d'études réalisées selon les méthodes d'analyse en cause. Si les méthodes d'analyse ne sont pas disponibles, il y a lieu de justifier cette non-disponibilité.

ANNEXE X**EXIGENCES EN MATIÈRE D'INFORMATIONS STANDARD
POUR LES SUBSTANCES FABRIQUÉES OU IMPORTÉES EN QUANTITÉS ÉGALES
OU SUPÉRIEURES À 1 000 TONNES ¹**

Au niveau visé par la présente annexe, le déclarant est tenu de présenter une proposition et un calendrier pour se conformer aux exigences en matière d'informations visées dans la présente annexe, conformément à l'article 12, paragraphe 1, point e).

La colonne 1 de la présente annexe indique les informations standard qui doivent être fournies pour toutes les substances fabriquées ou importées en quantités égales ou supérieures à mille tonnes, conformément à l'article 12, paragraphe 1, point e). En conséquence, les informations exigées à la colonne 1 de la présente annexe viennent s'ajouter à celles qui sont exigées à la colonne 1 des annexes VII, VIII et IX. Il y a lieu de fournir toute autre information disponible pertinente d'ordre physicochimique, toxicologique et écotoxicologique. La colonne 2 de la présente annexe énumère les règles spécifiques selon lesquelles le déclarant peut proposer d'omettre les informations standard, les remplacer par d'autres informations, les fournir à un stade différent ou les adapter d'une autre manière. Si les conditions auxquelles la colonne 2 de la présente annexe subordonne les propositions d'adaptations sont remplies, le déclarant en fait clairement état et précise les raisons de chaque proposition d'adaptation sous les rubriques appropriées du dossier d'enregistrement.

Outre ces dispositions spécifiques, un déclarant peut proposer d'adapter les informations standard exigées, mentionnées à la colonne 1 de la présente annexe, selon les dispositions générales énoncées à l'annexe XI. Dans ce cas également, il indique clairement les raisons de toute décision de proposer des adaptations aux informations standard sous les rubriques appropriées dans le dossier d'enregistrement en se référant aux règles spécifiques appropriées de la colonne 2 ou des annexes XI.²

¹ La présente annexe s'applique aux producteurs d'articles qui, en vertu de l'article 7, sont tenus de demander l'enregistrement et, mutatis mutandis, aux autres utilisateurs en aval qui sont tenus de procéder à des essais par le présent règlement.

² Note: les conditions dans lesquelles un essai spécifique n'est pas exigé qui sont fixées dans les méthodes d'essai appropriées dans le règlement de la Commission concernant les méthodes d'essai, tel que spécifié à l'article 13, paragraphe 3, qui ne sont pas répétées dans la colonne 2, s'appliquent également.

Avant la réalisation de nouveaux essais pour déterminer les propriétés mentionnées dans la présente annexe, l'ensemble des données in vitro, des données in vivo, des données humaines historiques, des données R(Q)SA valides et des données de substances structurellement apparentées (par référence croisée) qui sont disponibles sont d'abord évaluées. Il y a lieu d'éviter les essais in vivo qui utilisent des substances corrosives à des niveaux de concentration/dose qui entraînent la corrosivité. Avant les essais, il y a lieu de consulter, outre la présente annexe, d'autres guides sur les stratégies d'essais.

S'il est proposé de ne pas fournir d'informations concernant certains effets pour des raisons autres que celles visées à la colonne 2 de la présente annexe ou à l'annexe XI, il y a également lieu d'en faire clairement état et d'en préciser les raisons.



8. INFORMATIONS TOXICOLOGIQUES

COLONNE 1 INFORMATIONS STANDARD EXIGÉES	COLONNE 2 RÈGLES SPÉCIFIQUES APPLICABLES AUX ADAPTATIONS PAR RAPPORT À LA COLONNE 1
	<p>8.4. Si une des études de génotoxicité in vitro des annexes VII ou VIII donne un résultat positif, un deuxième essai sur cellules somatiques in vivo peut être nécessaire en fonction de la qualité et de la pertinence de toutes les données disponibles.</p> <p>Si une étude sur cellules somatiques in vivo disponible donne un résultat positif, il y a lieu d'envisager le potentiel de mutagénicité sur cellules germinales en se fondant sur toutes les données disponibles, y compris les preuves toxicocinétiques. Si aucune conclusion claire ne peut être tirée quant à la mutagénicité sur cellules germinales, d'autres recherches sont envisagées.</p>



COLONNE 1 INFORMATIONS STANDARD EXIGÉES	COLONNE 2 RÈGLES SPÉCIFIQUES APPLICABLES AUX ADAPTATIONS PAR RAPPORT À LA COLONNE 1
	<p>8.6.3 . Une étude de toxicité à long terme par administration répétée (≥ 12 mois) peut être proposée par le déclarant ou exigée par l'Agence conformément aux articles 39 ou 40 si la fréquence et la durée de l'exposition humaine montrent qu'une étude à plus long terme est appropriée et l'une des conditions suivantes est remplie:</p> <ul style="list-style-type: none"> - si l'étude de 28 ou de 90 jours a fait apparaître des effets de toxicité sévères ou graves, suscitant des préoccupations particulières, et dont les éléments disponibles ne permettent pas l'évaluation toxicologique ou la caractérisation des risques; ou - si des effets apparus dans des substances dont la structure moléculaire présente une relation étroite avec celle de la substance étudiée n'ont pas été détectés par l'étude de 28 jours ou de 90 jours; ou - si la substance risque d'avoir une propriété dangereuse qui ne peut être détectée par une étude de 90 jours.

COLONNE 1 INFORMATIONS STANDARD EXIGÉES	COLONNE 2 RÈGLES SPÉCIFIQUES APPLICABLES AUX ADAPTATIONS PAR RAPPORT À LA COLONNE 1
	<p>8.6.4 Des études supplémentaires sont proposées par le déclarant ou peuvent être exigées par l'Agence conformément aux articles 40 ou 41 dans les cas suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> - toxicité particulièrement préoccupante (par exemple: effets sérieux/graves); ou - indications montrant l'existence d'un effet dont les éléments disponibles ne permettent pas l'évaluation toxicologique et/ou la caractérisation des risques. Dans ces cas-là, il peut également être plus approprié de réaliser des études toxicologiques spécifiques en vue d'étudier l'effet en cause (par exemple, immunotoxicité, neurotoxicité); ou - préoccupations particulières concernant l'exposition (par exemple: utilisation dans des produits de consommation, entraînement des niveaux d'exposition qui sont proches des niveaux de dose auxquels une toxicité est observée).
8.7. Toxicité pour la reproduction	<p>8.7 Les études ne doivent pas être réalisées:</p> <ul style="list-style-type: none"> - s'il est avéré que la substance est un cancérigène génotoxique et que des mesures appropriées de gestion des risques sont mises en œuvre; ou - s'il est avéré que la substance est un mutagène sur cellules germinales et que des mesures appropriées de gestion des risques sont mises en œuvre; ou

COLONNE 1 INFORMATIONS STANDARD EXIGÉES	COLONNE 2 RÈGLES SPÉCIFIQUES APPLICABLES AUX ADAPTATIONS PAR RAPPORT À LA COLONNE 1
	<p>- si la substance a une faible activité toxicologique (si aucun des tests disponibles n'a fourni de preuves de toxicité), si des données toxicocinétiques permettent de prouver qu'aucune absorption systémique ne se produit par les voies d'exposition prises en considération (par exemple: concentrations plasmas/sang inférieures à la limite de détection en cas d'utilisation d'une méthode sensible, et absence de la substance et de métabolites de la substance dans l'urine, la bile ou l'air exhalé), et s'il n'y a pas d'exposition humaine ou pas d'exposition humaine importante.</p>
	<p>Si une substance est connue pour avoir des effets néfastes sur la fertilité, répond aux critères de classification des catégories 1 ou 2 pour la classe R60, et que les données disponibles conviennent à une évaluation robuste des risques, il ne sera pas nécessaire de procéder à d'autres essais en matière de fertilité. Il faudra toutefois envisager des essais portant sur la toxicité sur le développement.</p> <p>Si une substance est connue pour être à l'origine de toxicité sur le développement, répond aux critères de classification des catégories 1 ou 2 pour la classe R61, et que les données disponibles conviennent à une évaluation robuste des risques, il ne sera pas nécessaire de procéder à d'autres essais en matière de toxicité sur le développement. Il faudra, toutefois, envisager des essais concernant les effets sur la fertilité.</p>

COLONNE 1 INFORMATIONS STANDARD EXIGÉES	COLONNE 2 RÈGLES SPÉCIFIQUES APPLICABLES AUX ADAPTATIONS PAR RAPPORT À LA COLONNE 1
8.7.2. Étude de toxicité au stade du développement, une espèce, voie d'administration la plus appropriée, compte tenu de la voie probable de l'exposition humaine.	
8.7.3. Étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations, une seule espèce, mâle et femelle, voie d'administration la plus appropriée, compte tenu de la voie probable de l'exposition humaine, sauf si ces données sont déjà fournies en vertu des prescriptions de l'annexe IX.	

COLONNE 1 INFORMATIONS STANDARD EXIGÉES	COLONNE 2 RÈGLES SPÉCIFIQUES APPLICABLES AUX ADAPTATIONS PAR RAPPORT À LA COLONNE 1
8.9.1 Étude de carcinogénicité	<p>8.9.1 Une étude de carcinogénicité peut être proposée par le déclarant ou peut être exigée par l'Agence, conformément aux articles 40 ou 41 :</p> <ul style="list-style-type: none"> - si la substance a une large utilisation dispersive ou s'il existe des preuves d'une exposition humaine fréquente ou durable; et - si la substance est classée comme mutagène, catégorie 3, ou si la ou les études par administration répétée montrent qu'elle peut provoquer l'hyperplasie et/ou des lésions préneoplastiques. <p>Si les substances sont classées comme mutagènes, catégorie 1 ou 2, l'hypothèse par défaut est qu'un mécanisme génotoxique de carcinogénicité est probable. Dans ces cas, un essai de carcinogénicité n'est normalement pas nécessaire.</p>



9. INFORMATIONS ÉCOTOXICOLOGIQUES

COLONNE 1 INFORMATIONS STANDARD EXIGÉES	COLONNE 2 RÈGLES SPÉCIFIQUES APPLICABLES AUX ADAPTATIONS PAR RAPPORT À LA COLONNE 1
9.2. Dégradation	9.2. Des essais de dégradation biotique supplémentaires sont proposés si l'évaluation de la sécurité chimique, effectuée conformément à l'annexe I, fait apparaître la nécessité d'approfondir l'examen de la dégradation de la substance et de ses produits de dégradation. Le choix de ou des essais appropriés est fonction des résultats de l'évaluation de la sécurité chimique et peut inclure des essais de simulation dans des milieux appropriés (eau, sédiments ou sol, par exemple).
9.2.1. Biotique	
9.3. Devenir et comportement dans l'environnement	
9.3.4. Informations supplémentaires sur le devenir et le comportement dans l'environnement de la substance et/ou des produits de dégradation	9.3.4 Des essais supplémentaires sont proposés par le déclarant ou peuvent être exigés par l'Agence conformément aux articles 40 ou 41 si l'évaluation de la sécurité chimique, effectuée conformément à l'annexe I, fait apparaître la nécessité d'approfondir l'étude du devenir et du comportement de la substance. Le choix de ou des essais appropriés est fonction des résultats de l'évaluation de la sécurité chimique.

COLONNE 1 INFORMATIONS STANDARD EXIGÉES	COLONNE 2 RÈGLES SPÉCIFIQUES APPLICABLES AUX ADAPTATIONS PAR RAPPORT À LA COLONNE 1
9.4. Effets sur les organismes terrestres	9.4. Des essais de toxicité à long terme sont proposés par le déclarant si les résultats de l'évaluation de la sécurité chimique conformément à l'annexe I font apparaître la nécessité d'approfondir l'examen des effets de la substance et/ou des produits de dégradation sur les organismes terrestres. Le choix du ou des essais appropriés dépend du résultat de l'évaluation de la sécurité chimique. Ces études ne doivent pas être réalisées si une exposition directe et indirecte du milieu terrestre est peu probable.
9.4.4. Essais de toxicité à long terme sur des invertébrés, sauf si ces informations sont déjà fournies en vertu des prescriptions de l'annexe IX 9.4.6. Essais de toxicité à long terme sur des plantes, sauf si ces données sont déjà fournies en vertu des prescriptions de l'annexe IX	
9.5.1. Toxicité à long terme pour les organismes vivants dans des sédiments	9.5.1. Des essais de toxicité à long terme sont proposés par le déclarant si les résultats de l'évaluation de la sécurité chimique font apparaître la nécessité d'approfondir l'examen des effets de la substance et/ou des produits de dégradation sur les organismes vivants dans des sédiments. Le choix du ou des essais appropriés est fonction des résultats de l'évaluation de la sécurité chimique.
9.6.1. Toxicité à long terme ou toxicité pour la reproduction chez les oiseaux	9.6.1. Tout besoin en matière d'essais devrait être considéré avec soin en tenant compte du large ensemble de données concernant les mammifères qui est habituellement disponible pour ce niveau de quantité.

10. MÉTHODES DE DÉTECTION ET D'ANALYSE

Une description des méthodes d'analyse est fournie sur demande pour les milieux ayant fait l'objet d'études réalisées selon les méthodes d'analyse en cause. Si les méthodes d'analyse ne sont pas disponibles, il y a lieu de justifier cette non-disponibilité.

ANNEXE XI**RÈGLES GÉNÉRALES D'ADAPTATION DU RÉGIME D'ESSAIS STANDARD
VISÉ AUX ANNEXES VII À X**

Les annexes VII à X énoncent les exigences en matière d'information qui doivent être appliquées à l'ensemble des substances fabriquées ou importées en quantités de:

- une tonne ou plus, conformément à l'article 12, paragraphe 1, point a),
- dix tonnes ou plus, conformément à l'article 12, paragraphe 1, point c),
- cent tonnes ou plus, conformément à l'article 12, paragraphe 1, point d), et
- mille tonnes ou plus, conformément à l'article 12, paragraphe 1, point e).

Outre les règles spécifiques énoncées à la colonne 2 des annexes VII à X, un déclarant peut adapter le régime d'essai standard conformément aux règles générales énoncées à la section 1 de la présente annexe. Lors de l'évaluation du dossier, l'Agence peut évaluer ces adaptations du régime d'essai standard.

1. LES ESSAIS N'APPARAISSENT PAS COMME NÉCESSAIRES DU POINT DE VUE SCIENTIFIQUE
 - 1.1. Utilisation de données existantes
 - 1.1.1. Données sur les propriétés physicochimiques, provenant d'expériences qui n'ont pas été effectuées conformément aux BPL ou aux méthodes d'essai visées à l'article 13, paragraphe 3

Ces données sont considérées comme étant équivalentes à des données produites par les méthodes d'essai correspondantes visées à l'article 13, paragraphe 3, si les conditions suivantes sont remplies:

- 1) les données conviennent pour la classification et l'étiquetage, et/ou pour l'évaluation des risques,
- 2) une description suffisante de l'étude est fournie pour évaluer si elle est appropriée, et
- 3) les données sont valides pour l'effet examiné et l'étude est réalisée avec un niveau acceptable d'assurance de la qualité.

1.1.2. Données concernant la santé humaine et les propriétés relatives à l'environnement, provenant d'expériences qui n'ont pas été effectuées conformément aux BPL ou aux méthodes d'essai visées à l'article 13, paragraphe 3

Ces données sont considérées comme étant équivalentes à des données produites par les méthodes d'essai correspondantes visées à l'article 13, paragraphe 3, si les conditions suivantes sont remplies:

- 1) les données conviennent pour la classification et l'étiquetage, et/ou pour l'évaluation des risques,
- 2) les paramètres clés dont l'étude est prévue par les méthodes d'essai correspondantes visées à l'article 13, paragraphe 3, sont couverts de manière suffisante et fiable,
- 3) la durée de l'exposition est comparable ou supérieure à celle prévue par les méthodes d'essai correspondantes visées à l'article 13, paragraphe 3, si cette durée constitue un paramètre à prendre en considération, et
- 4) une description suffisante et fiable de l'étude est fournie.

1.1.3. Données humaines historiques

Des données humaines historiques, telles que celles issues des études épidémiologiques sur les populations exposées, celles portant sur des expositions accidentelles ou professionnelles, ainsi que les résultats d'études cliniques sont prises en considération.

La valeur des données pour un effet spécifique sur la santé humaine dépend, entre autres, du type d'analyse, des paramètres couverts, de l'ampleur et de la spécificité de la réponse et, par conséquent, de la prévisibilité de l'effet. Les critères pour évaluer le caractère approprié des données incluent:

- 1) la sélection et la caractérisation adéquates des groupes exposés et des groupes témoins,
- 2) la caractérisation appropriée de l'exposition,
- 3) la durée suffisante du suivi de l'apparition de la maladie,
- 4) la validité de la méthode suivie pour observer un effet,
- 5) la prise en compte appropriée des distorsions et des facteurs de confusion, et
- 6) une fiabilité statistique raisonnable, permettant de justifier la conclusion.

Dans tous les cas, il y a lieu de fournir une description suffisante et fiable.

1.2. Éléments de preuve

L'hypothèse/la conclusion qu'une substance possède ou non une propriété dangereuse particulière peut être confirmée valablement par des éléments de preuve provenant de plusieurs sources d'informations indépendantes, alors que les informations provenant de chacune de ces sources, considérées isolément, sont jugées insuffisantes pour permettre de formuler cette hypothèse/conclusion.

Le recours à des méthodes d'essai nouvellement mises au point, mais ne figurant pas encore parmi les méthodes visées à l'article 13, paragraphe 3, ou à une méthode d'essai internationale reconnue comme équivalente par la Commission ou par l'Agence, peut fournir des éléments de preuve suffisants pour permettre de conclure qu'une substance possède ou non une propriété dangereuse particulière.

Quand des éléments de preuve suffisants sont disponibles pour confirmer l'existence ou l'absence d'une propriété dangereuse particulière:

- il y a lieu de renoncer à des essais supplémentaires sur des animaux vertébrés en ce qui concerne la propriété en cause,
- il peut être renoncé à des essais supplémentaires n'utilisant pas d'animaux vertébrés.

Dans tous les cas, il y a lieu de fournir une description suffisante et fiable.

1.3. Relation qualitative ou quantitative structure-activité (RSA)

Les résultats obtenus à l'aide des modèles valides de la relation qualitative ou quantitative structure-activité (R(Q)SA) peuvent indiquer la présence ou l'absence d'une certaine propriété dangereuse. Les résultats de la R(Q)SA peuvent être utilisés au lieu de l'essai lorsque les conditions suivantes sont réunies:

- les résultats sont issus d'un modèle R(Q)SA dont la validité scientifique a été établie,
- la substance relève du domaine d'applicabilité du modèle R(Q)SA,
- les résultats conviennent pour la classification et l'étiquetage, et/ou pour l'évaluation des risques, et
- une description suffisante et fiable de la méthode appliquée est fournie.

En collaboration avec la Commission, les États membres et les parties intéressées, l'Agence élabore et fournit des orientations en évaluant quelles R(Q)SA satisferont à ces conditions et fournit des exemples.

1.4. Méthodes in vitro

Les résultats obtenus à partir de méthodes in vitro appropriées peuvent indiquer la présence d'une certaine propriété dangereuse ou peuvent avoir du poids par rapport à une conception mécanistique qui peut être importante pour l'évaluation. Dans ce contexte, "appropriées" signifie suffisamment bien élaborées conformément à des critères de développement d'essai internationalement reconnus (par exemple les critères du Centre pour la validation des méthodes d'essais alternatives (ECVAM) pour l'entrée d'un essai dans le processus de prévalidation). En fonction du risque potentiel, il peut être nécessaire d'obtenir une confirmation immédiate, exigeant des essais qui vont au-delà de ce qui est prévu aux annexes VII ou VIII, ou une confirmation ultérieure, exigeant des essais allant au-delà de ce qui est prévu aux annexes IX ou X pour le niveau de quantité en question.

Si les résultats obtenus à l'aide de telles méthodes *in vitro* ne font pas apparaître une certaine propriété dangereuse, l'essai en cause est cependant effectué au niveau de quantité approprié pour confirmer le résultat négatif, sauf dans les cas où les essais ne sont pas nécessaires conformément aux annexes VII à X ou à d'autres dispositions de la présente annexe.

Il peut être dérogé à cette obligation de confirmation si les conditions ci-après sont réunies:

- 1) les résultats sont dérivés d'une méthode *in vitro* dont la validité scientifique a été établie par une étude de validation, conformément aux principes de validation internationalement reconnus,
- 2) les résultats conviennent pour la classification et l'étiquetage, et/ou pour l'évaluation des risques, et
- 3) une description suffisante et fiable de la méthode appliquée est fournie.

1.5. Regroupement de substances et méthode des références croisées

Les substances dont les propriétés physicochimiques, toxicologiques et écotoxicologiques sont probablement similaires ou suivent un schéma régulier en raison de leur similarité structurelle peuvent être considérées comme un groupe ou une "catégorie" de substances. L'application du concept de groupe exige que les propriétés physicochimiques, les effets sur la santé humaine et l'environnement, ainsi que le devenir dans l'environnement puissent être prédits sur la base de données relatives à une ou des substances de référence appartenant au même groupe, par interpolation vers d'autres substances du groupe (méthode des références croisées). Cette méthode permet d'éviter de tester chaque substance pour chaque effet. L'Agence, après consultation des acteurs concernés et des autres parties intéressées, publie des orientations quant à la méthodologie appropriée techniquement et scientifiquement pour le regroupement des substances, ceci suffisamment à l'avance par rapport au premier délai d'enregistrement pour les substances bénéficiant d'un régime transitoire.

Les similarités peuvent être fondées sur les éléments suivants:

- 1) un groupe fonctionnel commun,
- 2) les précurseurs communs et/ou la probabilité de produits de dégradation communs résultant des processus physiques et biologiques, donnant naissance à des substances structurellement similaires, ou
- 3) un profil constant de la variation de la puissance des propriétés dans l'ensemble de la catégorie.

Si le concept de groupe est appliqué, les substances sont classées et étiquetées sur cette base.

Dans tous les cas, les résultats devraient:

- être appropriés aux fins de la classification et de l'étiquetage et/ou de l'évaluation des risques.
- les paramètres clés pris en considération par la méthode d'essai correspondante visée à l'article 13, paragraphe 3, sont couverts de manière suffisante et fiable,
- la durée de l'exposition est comparable ou supérieure à celle prévue par la méthode d'essai correspondante visée à l'article 13, paragraphe 3, si cette durée constitue un paramètre à prendre en considération, et
- il y a lieu de fournir une description suffisante et fiable de la méthode utilisée.

2. LES ESSAIS SONT TECHNIQUEMENT IMPOSSIBLES

Les essais relatifs à un effet spécifique peuvent être omis s'il est techniquement impossible de réaliser l'étude en raison des propriétés de la substance: par exemple, des substances très volatiles, hautement réactives ou instables ne peuvent être utilisées, un mélange de la substance avec l'eau peut engendrer un risque de feu ou une explosion, ou le radioétiquetage de la substance, exigé lors de certaines études, n'est pas possible. Il y a toujours lieu de respecter les orientations prévues par les méthodes d'essai visées à l'article 13, paragraphe 3, en ce qui concerne plus particulièrement les limites techniques d'une méthode spécifique.

3. ESSAIS TENANT COMPTE DE L'EXPOSITION, SPÉCIFIQUEMENT ADAPTÉS À UNE SUBSTANCE

- 3.1 Sur la base du ou des scénarios d'exposition élaborés dans le cadre du rapport sur la sécurité chimique, il peut être renoncé aux essais devant être effectués conformément à l'annexe VIII, sections 8.6 et 8.7, et aux annexes IX et X.
- 3.2 Dans tous les cas, il y a lieu de fournir une justification et une description suffisantes. La justification se fonde sur une évaluation de l'exposition établie en accord avec l'annexe I, section 5, et est conforme aux critères adoptés en vertu du point 3.3; les conditions d'utilisation particulières devront être transmises par le biais de la chaîne d'approvisionnement en matière chimique, conformément aux articles 31 ou 32.
- 3.3. La Commission adopte les mesures ayant pour objet de modifier des éléments non essentiels du présent règlement en le complétant, conformément à la procédure visée à l'article 133, paragraphe 4, en vue d'établir les critères définissant la notion de justification suffisante au titre de la section 3.2. au plus tard le 1^{er} décembre 2008.

ANNEXE XVII**RESTRICTIONS APPLICABLES À LA FABRICATION, LA MISE SUR LE MARCHÉ ET
L'UTILISATION DE CERTAINES SUBSTANCES ET PRÉPARATIONS DANGEREUSES ET
DE CERTAINS ARTICLES DANGEREUX**

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations	Conditions de limitation
1. Polychloroterphényles (PCT) - Préparations, y compris les huiles usagées, dont la teneur en PCT est supérieure à 0,005 % en poids.	1. Ne peuvent être utilisés. Toutefois, l'emploi des appareils, installations et fluides ci-après, en service à la date du 30 juin 1986, reste autorisé jusqu'à leur élimination ou la fin de leur durée de vie: a) appareils électriques en système clos; transformateurs, résistances et inductances; b) gros condensateurs (poids total \geq 1 kg); c) petits condensateurs; d) fluides caloporteurs dans les installations calorifiques en système clos; e) fluides hydrauliques pour l'équipement souterrain des mines

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations

Conditions de limitation

2. Un État membre peut, pour des raisons de protection de la santé humaine et de l'environnement, interdire l'emploi des appareils, installations et fluides visés au paragraphe 1 avant leur élimination ou avant la fin de leur durée de vie.
3. La mise sur le marché de l'occasion des appareils, installations et fluides visés au paragraphe 1 qui ne sont pas destinés à l'élimination est interdite.
4. Lorsqu'un État membre estime qu'il n'est pas possible, pour des raisons techniques, d'utiliser des articles de substitution, il peut autoriser l'emploi des PCT et de leurs préparations, dans la mesure où ceux-ci sont exclusivement destinés, dans des conditions normales d'entretien du matériel, à compléter les niveaux des liquides contenant des PCT dans des installations existantes en bon état de fonctionnement et achetées avant le 1er octobre 1985.
5. Un État membre peut, à condition d'adresser une notification préalable motivée à la Commission, accorder des dérogations à l'interdiction de mise sur le marché et de l'emploi des substances et préparations de base et intermédiaires, dans la mesure où il estime que ces dérogations n'entraînent pas d'effet dangereux pour la santé humaine et l'environnement.

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations	Conditions de limitation
	<p>6. Sans préjudice de l'application d'autres dispositions communautaires concernant l'étiquetage des substances et préparations dangereuses, les appareils et installations contenant des PCT doivent aussi comporter des indications concernant l'élimination des PCT, l'entretien et l'utilisation des appareils et installations qui en contiennent. Ces indications doivent pouvoir être lues à l'horizontale, lorsque l'objet contenant des PCT est installé normalement. L'inscription doit se détacher nettement de son fond et être rédigée dans une langue compréhensible sur le territoire où l'objet est utilisé.</p>
<p>2. Chloro-1-éthylène (chlorure de vinyle monomère).</p> <p>N° CAS 75-01-4</p> <p>N° EINECS 200-831-0</p>	<p>Ne peut être utilisé comme agent propulseur d'aérosols pour quelque'emploi que ce soit.</p>
<p>3. Substances ou préparations liquides qui sont considérées comme dangereuses au sens des définitions de la directive 67/548/CEE</p>	<p>1. Ne peuvent être utilisées:</p> <ul style="list-style-type: none"> - dans des objets décoratifs destinés à produire des effets de lumière ou de couleur obtenus par des phases différentes, par exemple dans des lampes d'ambiance et des cendriers, - dans des farces et attrapes, - dans des jeux destinés à un ou plusieurs participants ou dans tous les objets destinés à être utilisés comme tels, même sous des aspects décoratifs.

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations	Conditions de limitation
	<p>2. Sans préjudice du paragraphe 1, les substances et préparations qui:</p> <ul style="list-style-type: none">- présentent un danger en cas d'aspiration et sont étiquetées R65,- peuvent être utilisées comme combustible dans les lampes décoratives et- sont mises sur le marché dans des conditionnements dont la capacité est inférieure ou égale à 15 litres <p>ne peuvent contenir de colorant, excepté pour des raisons fiscales, ni de parfum.</p> <p>3. Sans préjudice de l'application d'autres dispositions communautaires relatives à la classification, à l'emballage et à l'étiquetage des substances et préparations dangereuses, l'emballage des substances et préparations visées au paragraphe 2, doit porter, lorsque ces substances et préparations sont destinées à des lampes, la mention ci-après, inscrite de manière lisible et indélébile:</p> <p>"Tenir les lampes remplies de ce liquide hors de portée des enfants".</p>
4. Phosphate de tri (2,3 dibromopropyle) N° CAS 126-72-7.	Ne peut être utilisé dans les articles textiles destinés à entrer en contact avec la peau, par exemple les vêtements, les sous-vêtements et les articles de lingerie.

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations	Conditions de limitation
5. Benzène N° CAS 71-43-2 N° EINECS 200-753-785	<ol style="list-style-type: none"><li data-bbox="750 320 1390 477">1. Ne peut être utilisé dans les jouets ou parties de jouets mis sur le marché, lorsque la concentration en benzène libre est supérieure à 5 mg/kg du poids du jouet ou d'une partie du jouet.<li data-bbox="750 521 1390 645">2. Ne peut être utilisé en concentration égale ou supérieure à 0,1 % masse dans les substances et préparations mises sur le marché.<li data-bbox="750 689 1390 745">3. Par dérogation, le paragraphe 2 n'est pas applicable:<ol style="list-style-type: none"><li data-bbox="750 790 1390 846">a) aux carburants qui font l'objet de la directive 98/70/CE;<li data-bbox="750 891 1390 1048">b) aux substances et préparations destinées à être mises en œuvre dans des procédés industriels ne permettant pas l'émission de benzène en quantité supérieure aux prescriptions de la législation existante;<li data-bbox="750 1093 1390 1209">c) aux déchets qui font l'objet de la directive 2006/12/CE et de la directive 91/689/CEE du Conseil du 12 décembre 1991 relative aux déchets dangereux.¹

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations	Conditions de limitation
6. Fibres d'amiante	
a) Crocidolite N° CAS 12001-28-4	1. La mise sur le marché et l'emploi de ces fibres et des articles auxquels elles ont été délibérément ajoutées sont interdits.
b) Amosite N° CAS 12172-73-5	
c) Anthophyllite N° CAS 77536-67-5	
d) Actinolite N° CAS 77536-66-4	Toutefois, les États membres peuvent exempter la mise sur le marché et l'utilisation de diaphragmes contenant du chrysotile (point f) pour des cellules d'électrolyse existantes jusqu'à ce qu'elles atteignent la fin de leur vie utile ou que, auparavant, des substituts appropriés sans amiante apparaissent sur le marché. La Commission réexaminera cette dérogation avant le 1 ^{er} janvier 2008.
e) Trémolite N° CAS 77536-68-66.2.	
f) Chrysotile 8 N° CAS 12001-29-5 N° CAS 132207-32-0	2. L'utilisation d'articles contenant les fibres d'amiante visés au paragraphe 1 ci-dessus qui étaient déjà installés et/ou en service avant le 1 ^{er} janvier 2005 continue d'être autorisée jusqu'à leur élimination ou leur fin de vie utile. Cependant, les États membres peuvent, pour des raisons de protection de la santé humaine, interdire l'utilisation de ces articles avant qu'ils soient éliminés ou qu'ils atteignent la fin de leur vie utile.

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations	Conditions de limitation
7. Oxyde de triaziridinylphosphine N° CAS 5455-55-1	<p>Les États membres n'autorisent plus l'introduction de nouvelles applications de l'amiante chrysotile sur leur territoire.</p> <p>3. Sans préjudice de l'application d'autres dispositions communautaires concernant la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances et préparations dangereuses, la mise sur le marché et l'utilisation de ces fibres et des articles contenant ces fibres sont, en application des dérogations précitées, autorisées seulement si l'article porte une étiquette conformément aux dispositions de l'appendice 7 de la présente annexe.</p>
8. Polybromobiphényle (PBB) N° CAS 59536-65-1	Ne peuvent être utilisés dans les articles textiles destinés à entrer en contact avec la peau, par exemple les vêtements, les sous-vêtements et les articles de lingerie.
9. Poudre de Panama (Quillaja saponaria) et ses dérivés contenant des saponines Poudre de racine d'Helleborus viridis et d'Helleborus niger Poudre de racine de Veratrum album et de Veratrum nigrum	<p>1. Ne peuvent être utilisés dans les farces et attrapes ou objets destinés à être utilisés comme tels, par exemple comme constituants de la poudre à éternuer et des boules puantes.</p> <p>2. Le paragraphe 1 ne s'applique cependant pas aux boules puantes d'un contenu ne dépassant pas 1,5 ml de liquide.</p>

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations	Conditions de limitation
Benzidine et/ou ses dérivés	
N°CAS 92-87-5	
N° EINECS 202-199-1	
o-nitrobenzaldéhyde	
N° CAS 552-89-06	
Poudre de bois	
10. Sulfure d'ammonium	
N° CAS 12135-76-1	
Hydrogénosulfure d'ammonium	
N° CAS 12124-99-1	
Polysulfure d'ammonium	
N° CAS 9080-17-5	
N° EINECS 232-989-1	

Dénomination de la substance, des groupes
de substances ou des préparations

Conditions de limitation

11. Les esters volatiles de l'acide
bromacétique:

Bromacétate de méthyle

N° CAS 96-32-2

N° EINECS 202-499-2

Bromacétate d'éthyle

N° CAS 105-36-2

N° EINECS 203-290-9

Bromacétate de propyle

N° CAS 35223-80-4

Bromacétate de butyle

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations	Conditions de limitation
12. 2-Naphtylamine N° CAS 9-1-59-8 N° EINECS 202-080-4 et ses sels	1. Ne peuvent être utilisés en concentration égale ou supérieure à 0,1 % masse dans les substances et préparations mises sur le marché. Par dérogation, cette disposition n'est pas applicable aux déchets contenant une ou plusieurs de ces substances et qui font l'objet des directives 2006/12/CE et 91/689/CEE.
13. Benzidine N° CAS 92-87-5 N° EINECS 202-199-1 et ses sels	2. Ces substances et préparations ne peuvent être vendues au grand public.
14. 4-Nitrodiphényle N° CAS 92-93-3 N° EINECS 202-204-7	3. Sans préjudice de l'application d'autres dispositions communautaires en matière de classification, emballage et étiquetage des substances et préparations dangereuses, l'emballage de telles préparations doit porter d'une manière lisible et indélébile la mention suivante:
15. 4-aminodiphényle, xénylamine N° CAS 92-67-1 N° EINECS 202-177-1 et ses sels	"Réservé aux utilisateurs professionnels".

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations	Conditions de limitation
<p>16. Carbonates de plomb:</p> <p>a) Carbonate anhydre neutre (PbCO₃)</p> <p>N° CAS 598-63-0</p> <p>N° EINECS 209-943-4</p> <p>b) Dihydroxybis (carbonate) de triplomb 2 PbCO₃ Pb(OH)₂</p> <p>N° CAS 1319-46-6</p> <p>N° EINECS 215-290-6</p> <p>17. Sulfates de plomb</p> <p>a) PbSO₄ (1:1)</p> <p>N° CAS 7446-14-2</p> <p>N° EINECS 231-198-9</p> <p>b) Pb_x SO₄</p> <p>N° CAS 15739-80-7</p> <p>N° EINECS 239-831-0</p>	<p>Ne peuvent être utilisés comme substances et composants de préparations destinées à être utilisées comme peintures, si ce n'est pour la restauration et l'entretien des œuvres d'art ainsi que de bâtiments historiques et de l'intérieur de ceux-ci dès lors que les États membres souhaitent l'autoriser sur leur territoire, conformément aux dispositions de la convention n°13 de l'OIT relative à l'utilisation du plomb blanc et de sulfates de plomb dans la peinture.</p>

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations	Conditions de limitation
18. Composés du mercure	<p data-bbox="759 320 1394 416">1. Ne peuvent être utilisés comme substances et composants de préparations destinées à être utilisées pour:</p> <p data-bbox="759 454 1394 551">a) empêcher la salissure par micro-organismes, plantes ou animaux sur:</p> <ul data-bbox="874 589 1394 913" style="list-style-type: none"><li data-bbox="874 589 1394 618">- les coques de bateaux;<li data-bbox="874 656 1394 779">- les cages, flotteurs, filets ainsi que tout autre appareillage ou équipement utilisé en pisciculture et conchyliculture;<li data-bbox="874 817 1394 913">- tout appareillage ou équipement totalement ou partiellement immergé; <p data-bbox="759 952 1394 981">b) la protection du bois;</p> <p data-bbox="759 1019 1394 1115">c) l'imprégnation de textiles lourds industriels et des fils destinés à leur fabrication;</p> <p data-bbox="759 1153 1394 1209">d) le traitement des eaux industrielles, indépendamment de leur utilisation.</p>

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations

Conditions de limitation

19. Composés de l'arsenic

2. La mise sur le marché de piles et accumulateurs contenant plus de 0,0005 % en poids de mercure, y compris dans les cas où ces piles et accumulateurs sont incorporés dans des appareils, est interdite. Les piles de type "bouton" ou les piles composées d'éléments de type "bouton" ne contenant pas plus de 2 % en poids de mercure ne sont pas soumises à cette interdiction.
1. Ne peuvent être utilisés comme substances et composés de préparations destinées à être utilisées pour:
- a) empêcher la salissure par micro-organismes, plantes ou animaux sur:
- les coques de bateaux,
 - les cages, flotteurs, filets ainsi que tout autre appareillage ou équipement utilisé en pisciculture et conchyliculture,
 - tout appareillage ou équipement totalement ou partiellement immergé;
- b) la protection du bois. En outre, le bois ainsi traité ne peut être mis sur le marché;

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations

Conditions de limitation

- c) cependant, par dérogation:
- i) les substances et préparations de protection du bois peuvent seulement être mises en œuvre dans les installations industrielles utilisant le vide ou la pression pour l'imprégnation du bois s'il s'agit de solutions de composés inorganiques du type CCA (cuivre-chrome-arsenic) de type C. Le bois ainsi traité ne peut être mis sur le marché avant que l'agent de protection ne soit complètement fixé;
 - ii) le bois traité aux solutions CCA dans les installations industrielles visées au point i) est mis sur le marché à l'usage professionnel et industriel lorsqu'il est mis en œuvre pour préserver l'intégrité structurelle du bois aux fins d'assurer la sécurité des hommes et des animaux et lorsqu'il est improbable que le public entre en contact cutané avec le bois au cours de sa durée de vie utile:
 - le bois de charpente de bâtiments publics, agricoles, administratifs et industriels,
 - les ponts et leurs ouvrages d'art,
 - le bois d'œuvre dans les eaux douces et saumâtres, par exemple, les jetées et les ponts,

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations

Conditions de limitation

- les écrans acoustiques,
- les paravalanches,
- les glissières et barrières de sécurité du réseau autoroutier,
- les pieux de clôture pour animaux, en conifère rond écorcé,
- les ouvrages de retenue des terres,
- les poteaux de transmission électrique et de télécommunications,
- les traverses de chemin de fer souterrain.

Sans préjudice de l'application d'autres dispositions communautaires en matière de classification, d'emballage et d'étiquetage des substances et préparations dangereuses, le bois traité mis sur le marché doit porter la mention individuelle "Réservé aux installations industrielles et aux utilisateurs professionnels, contient de l'arsenic". En outre, le bois mis sur le marché en emballages doit porter les mentions suivantes: "Portez des gants lorsque vous manipulez ce bois traité. Portez un masque anti-poussière et des lunettes de protection lorsque vous sciez ou par ailleurs usinez ce bois traité. Les déchets de ce bois traité doivent être traités comme des déchets dangereux par une entreprise agréée."

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations

Conditions de limitation

- iii) le bois traité visé aux points i) et ii) ne peut être utilisé:
- dans les constructions à usage d'habitation, indépendamment de leur destination,
 - dans toute application impliquant un risque de contact répété avec la peau,
 - dans les eaux marines,
 - à des fins agricoles autres que celles liées aux pieux de clôture pour animaux et aux usages de charpente ou autres structures visés au point ii),
 - dans toute application dans laquelle le bois traité risque d'entrer en contact avec des produits intermédiaires ou finis destinés à la consommation humaine et/ou animale.

2. Ne peuvent être utilisés comme substances et composants de préparations destinées à être utilisées pour le traitement des eaux industrielles, indépendamment de leur utilisation.

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations	Conditions de limitation
20. Composés organostanniques	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ne peuvent être mis sur le marché comme substances et composants de préparations destinées à être utilisées en tant que biocides dans des peintures à composants non liés chimiquement. 2. Ne peuvent être mis sur le marché ou utilisés comme substances et composants de préparations faisant fonction de biocides pour empêcher la salissure par micro-organismes, plantes ou animaux sur: <ol style="list-style-type: none"> a) tous les navires destinés à être utilisés sur des voies de navigation maritime, côtière, d'estuaire et intérieure et sur des lacs, quelle que soit leur longueur; b) les cages, les flotteurs, les filets ainsi que tout autre appareillage ou équipement utilisés en pisciculture ou en conchyliculture; c) tout appareillage ou équipement totalement ou partiellement immergé. 3. Ne peuvent être utilisés comme substances et composants de préparations destinées à être utilisées dans le traitement des eaux industrielles.
<p>21. Di-μ-oxo-di-n-butylstanniohydroxyborane; hydrogénoborate de dibutylétain</p> <p>C₈H₁₉BO₃Sn (DBB)</p> <p>N° CAS 75113-37-0</p> <p>N° ELINCS 401-040-5</p>	<p>Est interdit en concentration égale ou supérieure à 0,1 % dans les substances et composants de préparations mises sur le marché. Par dérogation, cette disposition n'est pas applicable à cette substance (DBB), ni aux préparations qui la contiennent et qui sont destinées à être exclusivement transformées en produits finis, dans lesquels cette substance n'apparaît plus dans une concentration égale ou supérieure à 0,1 %.</p>

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations	Conditions de limitation
22. Pentachlorophénol N° CAS 87-86-5 N° EINECS 201-778-6 et ses sels et esters	<p data-bbox="756 320 1355 450">1. Ne peuvent être utilisés en concentration égale ou supérieure à 0,1 % en masse dans les substances et les préparations mises sur le marché.</p> <p data-bbox="756 488 1355 517">2. Dispositions transitoires:</p> <p data-bbox="756 555 1355 846">À titre de dérogation, la France, l'Irlande, le Portugal, l'Espagne et le Royaume-Uni peuvent, jusqu'au 31 décembre 2008, ne pas appliquer cette disposition aux substances et aux préparations destinées à être utilisées dans des installations industrielles ne permettant pas l'émission et/ou le rejet de pentachlorophénol (PCP) en quantité supérieure à celle fixée par la réglementation en vigueur:</p> <p data-bbox="756 884 1355 913">a) pour le traitement des bois;</p> <p data-bbox="874 952 1355 1014">cependant, les bois traités ne peuvent être utilisés:</p> <ul data-bbox="874 1052 1355 1776" style="list-style-type: none"><li data-bbox="874 1052 1355 1182">- à l'intérieur d'immeubles, à des fins décoratives ou non, quelle que soit leur destination finale (habitation, travail, loisir),<li data-bbox="874 1220 1355 1776">- pour la fabrication et le traitement ultérieur:<ul data-bbox="949 1317 1355 1776" style="list-style-type: none"><li data-bbox="949 1317 1355 1379">i) de conteneurs destinés à l'agriculture;<li data-bbox="949 1417 1355 1608">ii) d'emballages pouvant entrer en contact avec des articles bruts, intermédiaires ou finis destinés à l'alimentation humaine et/ou animale;<li data-bbox="949 1646 1355 1776">iii) d'autres matériels susceptibles de contaminer les articles mentionnés aux points i) et ii);

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations

Conditions de limitation

- b) pour l'imprégnation de fibres et de textiles lourds qui ne sont en aucun cas destinés à l'habillement ou à l'ameublement à des fins décoratives;
- c) à titre exceptionnel, les États membres peuvent autoriser, au cas par cas, des professionnels spécialisés exerçant sur leur territoire à apporter un traitement curatif in situ, dans des bâtiments présentant un intérêt culturel, artistique ou historique, ou dans des cas d'urgence, aux bois de charpente ou aux maçonneries infectés par des pourritures sèches (*Serpula lacrymans*) et par des pourritures cubiques.

En tout état de cause:

- a) le pentachlorophénol utilisé en tant que tel ou dans la composition de préparations conformément aux dérogations visées ci-dessus doit avoir une teneur totale en hexachlorodibenzoparadiioxine (HCDD) ne dépassant pas deux parties par million (ppm);
- b) ces substances et ces préparations ne peuvent:
- être mises sur le marché que dans des emballages d'une capacité égale ou supérieure à 20 litres,
 - être vendues au grand public.

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations

Conditions de limitation

<p>23. Cadmium</p> <p>N° CAS 7440-43-9</p> <p>N° EINECS 231-152-8</p> <p>et ses composés</p>	<p>3. Sans préjudice de l'application d'autres dispositions communautaires en matière de classification, d'emballage et d'étiquetage des substances et préparations dangereuses, l'emballage des substances et préparations visées aux paragraphes 1 et 2 porte de manière lisible et indélébile la mention suivante:</p> <p>"Réservé aux utilisateurs industriels et professionnels."</p> <p>Cette disposition n'est pas applicable aux déchets relevant des directives 2006/12/CE et 91/689/CEE.</p> <p>1. Ne peuvent être utilisés pour colorer les articles finis fabriqués au départ des substances et préparations suivantes:</p> <p>a)</p> <ul style="list-style-type: none"> - chlorure de polyvinyle (PVC) [3904 10] [3904 21] [3904 22] - polyuréthane (PUR) [3909 50] - polyéthylène à basse densité, à l'exception du polyéthylène à basse densité utilisé pour la production de mélanges-maître colorés [3901 10] - acétate de cellulose (CA) [3912 11] [3912 12] - acétobutyrate de cellulose (CAB) [3912 11] [3912 12] - résine époxy [3907 30] - résine mélamine-formaldéhyde (MF) [3909 20]
--	---

3

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations

Conditions de limitation

- résine d'urée-formaldéhyde (UP) [3909 10]
- polyesters insaturés (UP) [3907 91]
- téréphtalate de polyéthylène (PET) [3907 60]
- téréphtalate de polybutylène (PBT)
- polystyrène cristal/standard [3903 11] [3903 19]
- méthacrylate de méthyle acrylènitrile (AMMA)
- polyéthylène réticulé (VPE)
- polystyrène impact/choc
- polypropylène (PP) [3902 10]

3

b) aux peintures [3208] [3209]

Toutefois, si les peintures ont une haute teneur en zinc, leurs concentrations en cadmium résiduelles sont aussi basses que possible et en tout cas ne dépassent pas 0,1 % en masse.

En tout cas, quelle que soit leur utilisation ou leur destination finale, est interdite la mise sur le marché des produits finis ou des composants des produits fabriqués à partir des substances et préparations énumérées ci-avant, colorées avec du cadmium, si leur teneur en cadmium (exprimée en Cd métal) est supérieure en masse à 0,01 % de la matière plastique.

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations

Conditions de limitation

2. Toutefois, le paragraphe 1 n'est pas applicable aux produits destinés à être colorés pour des raisons de sécurité.
3. Ne peuvent être utilisés pour stabiliser les produits finis suivants fabriqués au départ des polymères et copolymères du chlorure de vinyl:
- matériaux d'emballage (sacs, conteneurs, bouteilles, couvercles) [3923 29 10] [3920 41] [3920 42]
 - articles de bureau et articles scolaires [3926 10]
 - garnitures pour meubles, carrosseries ou similaire [3926 30]
 - vêtements et accessoires du vêtement (y compris les gants) [3926 20]
 - revêtements des sols et murs [3918 10]
 - tissus imprégnés, enduits, recouverts ou stratifiés [5903 10]
 - cuirs synthétiques [4202]
 - disques (musique) [852410]
 - tuyauteries et accessoires de raccordement [3917 23]
 - portes pivotantes (type "saloon")
 - véhicules pour le transport routier (intérieur, extérieur, bas de caisse)
 - recouvrement des tôles d'aciers utilisées en construction ou dans l'industrie
 - isolation des câbles électriques

3

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations

Conditions de limitation

En tout cas, quelle que soit leur utilisation ou leur destination finale, est interdite la mise sur le marché des produits finis, énumérés ci-avant, ou des composants de ces produits, fabriqués à partir des polymères et copolymères du chlorure de vinyl, stabilisés par des substances contenant du cadmium si leur teneur en cadmium (exprimée en Cd métal) est supérieure en masse à 0,01 % du polymère.

4. Toutefois, le paragraphe 3 n'est pas applicable aux produits finis utilisant des stabilisants à base de cadmium pour des raisons de sécurité.

5. Au sens du présent règlement, on entend par "traitement de surface au cadmium (cadmiage)" n'importe quel dépôt ou recouvrement de cadmium métallique sur une surface métallique.

Ne peuvent être utilisés pour le cadmiage des produits métalliques ou de composants des produits utilisés dans les secteurs/applications suivants:

- a) les équipements et machines pour:
- la production alimentaire: [8210] [8417 20] [8419 81] [8421 11] [8421 22] [8422] [8435] [8437] [8438] [8476 11]
 - l'agriculture [841931] [842481] [8432] [8433] [8434] [8436]
 - la réfrigération et la congélation [8418]
 - l'imprimerie et la presse [8440] [8442] [8443]

3

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations

Conditions de limitation

- | | | |
|----|---|---|
| b) | <p>les équipements et machines pour la production:</p> <ul style="list-style-type: none"> - des accessoires ménagers [7321] [8421 12] [8450] [8509] [8516] - de l'ameublement [8465] [8466] [9401] [9402] [9403] [9404] - des installations sanitaires [7324] - du chauffage central et du conditionnement d'air [7322] [8403] [8404] [8415] <p>En tous cas, quelle que soit leur utilisation ou leur destination finale, est interdite la mise sur le marché des produits finis cadmiés ou des composants de ces produits utilisés dans les secteurs/applications figurant aux points a) et b), ainsi que des produits manufacturés dans les secteurs visés au point b).</p> | 3 |
| 6. | <p>Les dispositions visées au paragraphe 5 sont également applicables aux produits cadmiés ou composants de ces produits lorsqu'ils sont utilisés dans les secteurs/applications figurant aux points a) et b), ainsi qu'aux produits manufacturés dans les secteurs visés au point b):</p> | |
| a) | <p>les équipements et machines pour la production:</p> <ul style="list-style-type: none"> - du papier et du carton [8419 32] [8439] [8441] - du textile et de l'habillement [8444] [8445] [8447] [8448] [8449] [8451] [8452] | 3 |

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations

Conditions de limitation

- b) les équipements et machines pour la production:
- de la manutention industrielle [8425] [8426] [8427] [8428] [8429] [8430] [8431]
 - des véhicules routiers et agricoles [chapitre 87]
 - des trains [chapitre 86]
 - des bateaux [chapitre 89]
7. Toutefois, les restrictions énoncées aux paragraphes 5 et 6 ne sont pas applicables aux:
- produits et composants des produits utilisés dans l'aéronautique, l'aérospatiale, l'exploitation minière, "off shore" et nucléaire, dont les applications requièrent un haut degré de sécurité, ainsi qu'aux organes de sécurité dans les véhicules routiers et agricoles, les trains et les bateaux,
 - contacts électriques, quels que soient leurs secteurs d'utilisation et ce pour des raisons de fiabilité de l'appareillage sur lequel ils sont installés.

3

Dénomination de la substance, des groupes
de substances ou des préparations

Conditions de limitation

En raison de l'évolution des connaissances et des techniques en matière de substituts moins dangereux que le cadmium et ses composés, la Commission, en consultation avec les États membres, réévalue la situation à intervalles réguliers selon la procédure prévue à l'article 133, paragraphe 3, du présent règlement.

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations	Conditions de limitation
24. Mono-méthyl-tétrachlorodiphénylméthane Nom commercial: Ugilec 141 N° CAS 76253-60-6	1. La mise sur le marché et l'utilisation de cette substance, des préparations et des produits qui en contiennent, sont interdites. 2. Par dérogation, le paragraphe 1 ne s'applique pas: a) aux installations ou machines qui étaient déjà en service le 18 juin 1994, jusqu'à ce que ces installations ou machines soient éliminées. Les États membres peuvent toutefois, pour des raisons de protection de la santé et de l'environnement, interdire sur leur territoire l'emploi de ces installations ou machines avant leur élimination; b) à l'entretien des installations ou machines déjà en service dans un État membre le 18 juin 1994. 3. Il est interdit de mettre sur le marché de l'occasion cette substance ainsi que les préparations et les installations ou machines qui en contiennent.
25. Mono-méthyl-dichlorodiphénylméthane Nom commercial: Ugilec 121, Ugilec 21 N° CAS inconnu	La mise sur le marché et l'emploi de cette substance, des préparations et des produits qui en contiennent sont interdits.

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations	Conditions de limitation
<p>26. Mono-méthyl-dibromodiphénylméthane bromobenzylbromotoluène, mélange d'isomères</p> <p>Nom commercial: DBBT</p> <p>N° CAS 99688-47-8</p>	<p>La mise sur le marché et l'emploi de cette substance, des préparations et des produits qui en contiennent sont interdits.</p>
<p>27. Nickel</p> <p>N° CAS 7440-02-0</p> <p>N° EINECS 231-111-4</p> <p>et ses composés</p>	<p>1. Ne peut être utilisé:</p> <p>a) dans tous les assemblages de tiges qui sont introduites dans les oreilles percées et dans les autres parties percées du corps humain, à moins que le taux de libération de nickel de ces assemblages de tiges ne soit inférieur à 0,2 µg par centimètre carré et par semaine (limite de migration);</p> <p>b) dans les types de produits destinés à entrer en contact direct et prolongé avec la peau, tels que:</p> <ul style="list-style-type: none"> - boucles d'oreilles, - colliers, bracelets et chaînes, bracelets de cheville et bagues, - boîtiers, bracelets et fermoirs de montre, - boutons à rivets, boucles, rivets, fermetures éclair et marques de métal, lorsqu'ils sont utilisés dans des vêtements, <p>si le taux de libération du nickel qui se dégage des parties de ces produits entrant en contact direct et prolongé avec la peau est supérieur à 0,5 µg par centimètre carré et par semaine;</p>

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations	Conditions de limitation
<p>28. Substances figurant à l'annexe I de la directive 67/548/CEE classées "cancérogène catégorie 1 ou cancérogène catégorie 2" et étiquetées au moins "Toxique (T)", avec la phrase de risque R 45: "Peut provoquer le cancer" ou la phrase de risque R 49: "Peut provoquer le cancer par inhalation", et reprises comme suit:</p> <p>Les substances cancérogènes de catégorie 1 sont énumérées à l'appendice 1.</p>	<p>c) dans les types de produits énumérés au paragraphe 1, point b), lorsqu'ils sont recouverts d'une matière autre que le nickel, à moins que ce revêtement ne soit suffisant pour assurer que le taux de libération du nickel qui se dégage des parties de ces produits entrant en contact direct et prolongé avec la peau ne dépasse pas 0,5 µg par centimètre carré et par semaine pendant une période d'utilisation normale du produit de deux ans au minimum.</p> <p>2. Les produits visés au paragraphe 1, points a) à c), ne peuvent être mis sur le marché que s'ils satisfont aux exigences qui y sont énoncées.</p> <p>3. Les normes adoptées par le Comité européen de normalisation (CEN) servent de procédures de test pour démontrer la conformité des produits aux paragraphes 1 et 2.</p> <p>Sans préjudice des autres parties de la présente annexe, les dispositions suivantes s'appliquent aux entrées 28 à 30.:</p> <p>1. Ne peuvent être utilisées dans les substances et préparations mises sur le marché et destinées à être vendues au grand public en concentration individuelle égale ou supérieure:</p> <ul style="list-style-type: none"> - soit à la concentration spécifiée à l'annexe I de la directive 67/548/CEE,

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations	Conditions de limitation
<p>Les substances cancérigènes de catégorie 2 sont énumérées à l'appendice 2.</p>	<p>- soit à la concentration spécifiée dans la directive 1999/45/CE.</p>
<p>29. Substances figurant à l'annexe I de la directive 67/548/CEE classées "mutagène catégorie 1 ou mutagène catégorie 2" et étiquetées avec la phrase de risque R 46: "Peut provoquer des altérations génétiques héréditaires", et reprises comme suit:</p> <p>Les substances mutagènes de catégorie 1 sont énumérées à l'appendice 3.</p> <p>Les substances mutagènes de catégorie 2 sont énumérées à l'appendice 4.</p>	<p>Sans préjudice de l'application d'autres dispositions communautaires en matière de classification, d'emballage et d'étiquetage des substances et préparations dangereuses, l'emballage de ces substances et préparations doit porter d'une manière lisible et indélébile la mention suivante:</p> <p>"Réservé aux utilisateurs professionnels".</p>
<p>30. Substances figurant à l'annexe I de la directive 67/548/CEE classées "toxiques pour la reproduction catégorie 1 ou toxiques pour la reproduction catégorie 2" et étiquetées avec la phrase de risque R 60: "Peut altérer la fertilité" et/ou R 61: "Risque pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant", et reprises comme suit:</p> <p>Les substances toxiques pour la reproduction de catégorie 1 sont énumérées à l'appendice 5.</p> <p>Les substances toxiques pour la reproduction de catégorie 2 sont énumérées à l'appendice 6.</p>	<p>2. Par dérogation, le paragraphe 1 n'est pas applicable:</p> <p>a) aux médicaments à usage médical ou vétérinaire au sens de la directive 2001/82/CE et de la directive 2001/83/CE;</p> <p>b) aux produits cosmétiques au sens de la directive 76/768/CEE du Conseil ¹³;</p> <p>c) - aux carburants visés par la directive 98/70/CE,</p> <p>- aux produits dérivés des huiles minérales, prévus pour être utilisés comme combustibles ou carburants dans des installations de combustion mobiles ou fixes,</p> <p>- aux combustibles vendus en système fermé (par exemple: bonbonnes de gaz liquéfié);</p> <p>d) aux couleurs pour artistes relevant de la directive 1999/45/CE.</p>

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations	Conditions de limitation
31. a) créosote; huile de lavage N° CAS 8001-58-9 N° EINECS 232-287-5	1. Ne peuvent être utilisées en tant que substances ou constituants de préparations pour le traitement du bois. En outre, la mise sur le marché du bois ainsi traité est interdite.
b) huile de créosote; huile de lavage N° CAS 61789-28-4 N° EINECS 263-047-8	2. Dérogations: a) Ces substances et préparations peuvent être utilisées pour le traitement du bois dans les installations industrielles ou par des utilisateurs professionnels visés par la législation communautaire sur la protection des travailleurs pour le retraitement exclusif in situ si elles contiennent:
c) distillats de goudron de houille, huiles de naphthalène; huile naphthalénique N° CAS 84650-04-4 N° EINECS 283-484-8	i) une concentration de benzo (a)pyrène inférieure à 0,005 % en poids; ii) une concentration de phénols extractibles par l'eau inférieure à 3 % en poids.
	Ces substances et préparations utilisées pour le traitement du bois dans les installations industrielles ou par des utilisateurs professionnels:

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations

Conditions de limitation

- d) huile de créosote, fraction acénaphène; huile de lavage

N° CAS 90640-84-9

N° EINECS 292-605-3

- e) distillats supérieurs de goudron de houille (charbon); huile anthracénique lourde

N° CAS 65996-91-0

N° EINECS 266-026-1

- f) huile anthracénique

N° CAS 90640-80-5

N° EINECS 292-602-7

- g) huiles acides de goudron de houille brutes; phénols bruts

N° CAS 65996-85-2

N° EINECS 266-019-3

- h) créosote de bois

N° CAS 8021-39-4

N° EINECS 232-419-1

- ne peuvent être mises sur le marché que dans un emballage d'une capacité de 20 litres ou plus,

- ne peuvent être vendues aux consommateurs.

Sans préjudice de l'application d'autres dispositions communautaires en matière de classification, d'emballage et d'étiquetage des substances et préparations dangereuses, l'emballage de ces substances et préparations doit porter d'une manière lisible et indélébile la mention suivante:

"Réservé aux installations industrielles ou aux utilisateurs professionnels".

- b) Les bois traités dans les installations industrielles ou par des utilisateurs professionnels selon le point a) et qui sont mis sur le marché pour la première fois ou retraités in situ sont réservés à un usage exclusivement professionnel et industriel, comme, par exemple, dans les chemins de fer, les lignes électriques, les clôtures, l'agriculture (par exemple, échelas d'arbres fruitiers), les installations portuaires ou les voies fluviales.

- c) L'interdiction de mise sur le marché énoncée au paragraphe 1 ne s'applique pas aux bois traités avec des substances visées au point 31, points a) à i), avant le 31 décembre 2002 et placés sur le marché de l'occasion en vue d'une réutilisation.

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations

i) résidus d'extraction alcalins (charbon), goudron de houille à basse température

N° CAS 122384-78-5

N° EINECS 310-191-5

Conditions de limitation

3. Cependant, les bois traités selon le paragraphe 2, points b) et c), ne peuvent être utilisés:
- à l'intérieur de bâtiments, quelle que soit leur destination,
 - dans les jouets,
 - sur les terrains de jeu,
 - dans les parcs, jardins ou autres lieux récréatifs publics situés en plein air en cas de risque de contact fréquent avec la peau,
 - dans la fabrication de meubles de jardin, tels que les tables de camping,
 - pour la confection, l'utilisation et le retraitement:
 - de conteneurs destinés à la culture,
 - d'emballages pouvant entrer en contact avec des produits bruts, intermédiaires et/ou finis destinés à l'alimentation humaine et/ou animale,
 - des autres matériels susceptibles de contaminer lesdits produits.

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations	Conditions de limitation
32. Chloroforme N° CAS 67-66-3 N° EINECS 200-663-8	1. Ne peuvent être utilisés en concentration supérieure ou égale à 0,1 % dans les substances et préparations destinées à la vente au grand public et/ou aux applications conduisant à une diffusion, telles que le nettoyage des surfaces et le nettoyage des tissus.
33. Tétrachlorure de carbone tétrachlorométhane N° CAS 56-23-5 N° EINECS 200-262-8	2. Sans préjudice de l'application d'autres dispositions communautaires concernant la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances et préparations dangereuses, l'emballage de ces substances et des préparations qui en contiennent en concentration supérieure ou égale à 0,1 % doit porter l'inscription lisible et indélébile suivante:
34. 1,1,2-trichloroéthane N° CAS 79-00-5 N° EINECS 201-166-9	"Réservé aux installations industrielles". Par dérogation, cette disposition n'est pas applicable:

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations		Conditions de limitation	
35.	1,1,2,2-tétrachloroéthane N° CAS 79-34-5 N° EINECS 201-197-8	a)	aux médicaments ou produits vétérinaires tels que définis par les directives 2001/82/CE et 2001/83/CE;
36.	1,1,1,2-tétrachloroéthane N° CAS 630-20-6	b)	aux produits cosmétiques tels que définis par la directive 76/768/CEE.
37.	Pentachloroéthane N° CAS 76-01-7 N° EINECS 200-925-1		
38.	1,1-dichloroéthylène N° CAS 75-35-4 N° EINECS 200-864-0		
39.	1,1,1-trichloroéthane, méthylchloroforme N° CAS 71-55-6 N° EINECS 200-756-3		

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations

40. Substances conformes aux critères d'inflammabilité définis dans la directive 67/548/CEE et classées comme inflammables, facilement inflammables ou extrêmement inflammables, qu'elles figurent ou non à l'annexe 1 de ladite directive

Conditions de limitation

1. Ne peuvent être utilisées isolément ou sous la forme de préparations dans des générateurs d'aérosols mis sur le marché à l'intention du grand public à des fins de divertissement et de décoration comme:
- les scintillants métallisés destinés principalement à la décoration,
 - la neige et le givre artificiels,
 - les coussins "pêteurs",

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations

Conditions de limitation

- les bombes à serpentins,
- les excréments factices,
- les mirlitons,
- les paillettes et les mousses décoratives
- les toiles d'araignée artificielles
- les boules puantes,
- etc.

2. Sans préjudice de l'application d'autres dispositions communautaires en matière de classification, d'emballage et d'étiquetage des substances dangereuses, l'emballage des générateurs d'aérosols visés ci-dessus doit porter d'une manière visible et indélébile la mention suivante:

"Usage réservé aux utilisateurs professionnels".

3. Par dérogation, les paragraphes 1 et 2 ne sont pas applicables aux générateurs d'aérosols visés à l'article 9 bis de la directive 75/324/CEE⁴ du Conseil du 20 mai 1975 concernant le rapprochement des législations des États membres relatives aux générateurs aérosols.

4. Les produits visés aux paragraphes 1 et 2 peuvent être mis sur le marché que s'ils satisfont aux exigences qui y sont énoncées.

41. Hexachloroéthane
N° CAS 67-72-1
N° EINECS 200-6664

Ne peut être utilisé dans la fabrication ou la transformation des métaux non ferreux.

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations	Conditions de limitation
42. Alcanes en C ₁₀ -C ₁₃ , chloro (paraffines chlorées à chaîne courte SCCP) N° EINECS 287-476-5	Ne peuvent être mis sur le marché en tant que substances ou constituants d'autres substances ou préparations à des concentrations supérieures à 1 % pour: - l'usinage des métaux, - le graissage du cuir.
43. Colorants azoïques	1. Les colorants azoïques pouvant libérer, par coupure réductrice d'un ou plusieurs groupements azoïques, une ou plusieurs des amines aromatiques énumérées dans l'appendice 8 du présent règlement, en concentrations détectables, c'est-à-dire supérieures à 30 ppm dans les articles finis ou dans les parties teintes de ceux-ci, selon les méthodes d'essai énumérées dans l'appendice 10, ne peuvent être utilisés dans les articles en tissu et en cuir susceptibles d'entrer en contact direct et prolongé avec la peau humaine ou la cavité buccale, tels que: - vêtements, literie, serviettes de toilette, postiches, perruques, chapeaux, couches et autres articles d'hygiène, sacs de couchage, - chaussures, gants, bracelets de montre, sacs à main, porte-monnaie/portefeuilles, porte-documents, dessus de chaises, porte-monnaie portés autour du cou, - jouets en tissu ou en cuir et jouets comportant des accessoires en tissu ou en cuir, - fil et étoffes destinés au consommateur final. 2. En outre, les articles en tissu ou en cuir visés au paragraphe 1 ne peuvent être mis sur le marché, sauf s'ils sont conformes aux exigences fixées dans ce paragraphe

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations	Conditions de limitation
44. Diphényléther, dérivé pentabromé C ₁₂ H ₅ Br ₅ O	<p>3. Les colorants azoïques énumérés dans la "liste des colorants azoïques" figurant à l'appendice 9 ne peuvent être mis sur le marché ou utilisés pour teindre des articles en tissu ou en cuir en tant que substance ou composante de préparation à des concentrations supérieures à 0,1 % en masse.</p> <p>4. La Commission procède, à la lumière des nouvelles connaissances scientifiques, au réexamen des dispositions relatives aux colorants azoïques.</p>
	<p>1. Ne peut être mis sur le marché ni employé en tant que substance ou constituant de préparations à des concentrations supérieures à 0,1 % en masse.</p> <p>2. Les articles ne peuvent être mis sur le marché s'ils (ou des parties d'eux-mêmes agissant comme retardateurs de flammes) contiennent cette substance à des concentrations supérieures à 0,1 % en masse.</p>
45. Diphényléther, dérivé octabromé C ₁₂ H ₂ Br ₈ O	<p>1. Ne peut être mis sur le marché ni employé en tant que substance ou constituant de préparations à des concentrations supérieures à 0,1 % en masse.</p> <p>2. Les articles ne peuvent être mis sur le marché s'ils (ou des parties d'eux-mêmes agissant comme retardateurs de flammes) contiennent cette substance à des concentrations supérieures à 0,1 % en masse.</p>

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations	Conditions de limitation
46. a) Nonylphénol $C_{18}H_{19}OH$ b) Éthoxylate de nonylphénol $(C_{18}H_{19}O)_n$	<p>Ne peut être mis sur le marché ni employé en tant que substance ou constituant de préparations à des concentrations égales ou supérieures à 0,1 % en masse dans les cas suivants:</p> <ol style="list-style-type: none">1) nettoyage industriel et institutionnel, sauf:<ul style="list-style-type: none">- les systèmes fermés et contrôlés de nettoyage à sec dans lesquels le liquide de nettoyage est recyclé ou incinéré;- les systèmes de nettoyage avec traitement spécial dans lesquels le liquide de nettoyage est recyclé ou incinéré;2) nettoyage domestique;3) traitement des textiles et du cuir, sauf:<ul style="list-style-type: none">- traitement sans rejet dans les eaux usées,- systèmes comportant un traitement spécial dans lequel l'eau utilisée est prétraitée afin de supprimer totalement la fraction organique avant le traitement biologique des eaux usées (dégraissage de peaux de mouton);

Dénomination de la substance, des groupes
de substances ou des préparations

Conditions de limitation

- 4) émulsifiant dans les produits agricoles de traitement par immersion des trayons;
- 5) usinage des métaux, sauf:
 - utilisation dans le cadre de systèmes fermés et contrôlés dans lesquels le liquide de nettoyage est recyclé ou incinéré;
- 6) fabrication de pâte à papier et de papier;
- 7) produits cosmétiques;
- 8) autres produits d'hygiène corporelle, sauf:
 - spermicides;
- 9) coformulants dans les pesticides et biocides.

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations	Conditions de limitation
47. Ciment	<ol style="list-style-type: none"><li data-bbox="753 320 1331 483">1. Le ciment et les préparations contenant du ciment ne peuvent être utilisés ou mis sur le marché s'ils contiennent, lorsqu'ils sont hydratés, plus de 0,0002 % de chrome VI soluble du poids sec total du ciment.<li data-bbox="753 521 1331 981">2. Si des agents réducteurs sont utilisés - et sans préjudice de l'application d'autres dispositions communautaires concernant la classification, l'emballage et l'étiquetage de substances et préparations dangereuses - l'emballage du ciment ou de préparations contenant du ciment doit comporter des informations lisibles et indélébiles indiquant la date d'emballage, les conditions de stockage et la période de stockage appropriée afin que l'agent réducteur reste actif et que le contenu en chrome VI soluble soit maintenu en dessous de la limite visée au point 1.<li data-bbox="753 1019 1331 1314">3. Par dérogation, les points 1 et 2 ne s'appliquent pas à la mise sur le marché et à l'emploi dans le cadre de procédés contrôlés fermés et totalement automatisés, dans lesquels le ciment et les préparations contenant du ciment sont traités exclusivement par des machines, et où il n'existe aucun risque de contact avec la peau.

Dénomination de la substance, des groupes
de substances ou des préparations

48. Toluène

N° CAS 108-88-3

Conditions de limitation

Ne peut pas être mis sur le marché ni utilisé en tant que substance ou comme constituant de préparations à une concentration égale ou supérieure à 0,1 % en masse dans les adhésifs et dans les peintures par pulvérisation destinés à la vente au public.

Les États membres appliquent ces mesures à partir du 15 juin 2007.

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations	Conditions de limitation
49. Trichlorobenzène N° CAS 120-82-1	<p>Ne peut pas être mis sur le marché ni utilisé en tant que substance ou comme constituant de préparations à une concentration égale ou supérieure à 0,1 % en masse pour toutes les utilisations excepté:</p> <ul style="list-style-type: none">- comme intermédiaire de synthèse, ou- comme solvant réactionnel utilisé en système fermé pour les réactions de chloration, ou- pour la fabrication de 1,3,5-trinitro-2,4,6-triaminobenzène (TATB). <p>Les États membres appliquent ces mesures à partir du 15 juin 2007.</p>

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations	Conditions de limitation
50. Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)	1. Les huiles de dilution ne peuvent être mises sur le marché et utilisées pour la production de pneumatiques ou parties de pneumatiques, si elles contiennent:
1. Benzo(a)pyrène (BaP)	- plus de 1 mg/kg de BaP, ou
N° CAS 50-32-8	- plus de 10 mg/kg de la somme de tous les HAP énumérés.
2. Benzo(e)pyrène (BeP)	Ces limites sont considérées comme respectées si l'extrait d'aromatique polycyclique (CAP), mesuré conformément à la norme IP 346/1998 de l'Institut du pétrole (détermination d'aromatiques polycycliques dans les huiles de base lubrifiantes inutilisées et les coupes pétrolières sans asphaltène — méthode de l'indice de réfraction de l'extraction de diméthyl-sulfoxyde (DMSO)], est inférieur à 3 % en masse, à condition que la conformité avec les valeurs limites de BaP et des HAP énumérés ainsi que la corrélation entre ces valeurs mesurées et l'extrait d'aromatique polycyclique (CAP) soient contrôlées par le fabricant ou l'importateur tous les six mois ou après chaque changement d'exploitation important, la date retenue étant la plus proche.
N° CAS 192-97-2	2. D'autre part, les pneumatiques et les chapes de rechapage produits après le 1 ^{er} janvier 2010 ne peuvent être mis sur le marché s'ils contiennent des huiles de dilution dépassant les limites indiquées au paragraphe 1.
3. Benzo(a)anthracène (BaA)	Ces limites sont considérées comme respectées si la valeur limite de 0,35 % de protons de Baie (Hbaie), mesurée et calculée selon la norme ISO 21461 (gomme vulcanisée — détermination de l'aromaticité de l'huile dans les composés de gommes vulcanisées) n'est pas dépassée dans les composés de caoutchouc vulcanisé.
N° CAS 56-55-3	3. À titre de dérogation, le paragraphe 2 ne s'applique pas aux pneumatiques rechapés si leur chape ne contient pas d'huiles de dilution excédant les limites indiquées au paragraphe 1.
4. Chrysène (CHR)	4. Les États membres appliquent ces mesures à partir du 1 ^{er} janvier 2010.
N° CAS 218-01-9	
5. Benzo(b)fluoranthène (BbFA)	
N° CAS 205-99-2	
6. Benzo(j)fluoranthène (BjFA)	
N° CAS 205-82-3	
7. Benzo(k)fluoranthène (BkFA)	
N° CAS 207-08-9	
8. Dibenzo(a, h)anthracène (DBAhA)	
N° CAS 53-70-3	

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations	Conditions de limitation
<p>51. Les phtalates suivants (ou les autres numéros CAS et EINECS couvrant la substance):</p> <p>di (2-éthylhexyl) phtalate (DEHP) N ° CAS 117-81-7 N ° EINECS 204-211-0</p> <p>dibutyl phtalate (DBP) N ° CAS 84-74-2 N ° EINECS 201-557-4</p> <p>butyl benzyl phtalate (BBP) N ° CAS 85-68-7 N ° EINECS 201-622-7</p>	<p>Ne peuvent pas être utilisés comme substances ou composants de préparations, à des concentrations supérieures à 0,1 % en masse de matière plastifiée, dans les jouets et les articles de puériculture ¹.</p> <p>Les jouets et articles de puériculture contenant ces phtalates dans une concentration supérieure à 0,1 % en masse de matière plastifiée ne peuvent pas être mis sur le marché.</p> <p>Au plus tard le 16 janvier 2010, la Commission réévalue les mesures prévues par ce point à la lumière des nouvelles informations scientifiques concernant ces substances et leurs substances de remplacement et, si cela se justifie, ces mesures seront modifiées en conséquence.</p>

1

Aux fins du présent point, on entend par "article de puériculture" tout produit destiné à faciliter le sommeil, la relaxation, l'hygiène ainsi que l'alimentation et la succion des enfants

Dénomination de la substance, des groupes de substances ou des préparations	Conditions de limitation
<p>52. Les phtalates suivants (ou les autres numéros CAS et Eines couvrant la substance):</p> <p>di-"isononyl" phtalate(DINP) N ° CAS 28553-12-0 et 68515-48-0 N ° Eines 249-079-5 et 271-090-9</p> <p>di-"isodecyl" phtalate (DIDP) N ° CAS 26761-40-0 et 68515-49-1 N ° Eines 247-977-1 et 271-091-4</p> <p>di-n-octyl phtalate (DNOP) N ° CAS 117-84-0 N ° Eines 204-214-7</p>	<p>Ne peuvent pas être utilisés comme substances ou composants de préparations, à des concentrations supérieures à 0,1 % en masse de matière plastifiée, dans les jouets et les articles de puériculture qui peuvent être mis en bouche par les enfants ¹.</p> <p>Les jouets et articles de puériculture contenant ces phtalates dans une concentration supérieure à 0,1 % en masse de matière plastifiée ne peuvent pas être mis sur le marché.</p> <p>Au plus tard le 16 janvier 2010, la Commission réévalue les mesures prévues par ce point à la lumière des nouvelles informations scientifiques concernant ces substances et leurs substances de remplacement et, si cela se justifie, ces mesures seront modifiées en conséquence.</p>

- ¹ JO L 377 du 31.12.1991, p. 20. Directive modifiée en dernier lieu par le règlement (CE) n° 166/2006 du Parlement européen et du Conseil (JO L 33 du 4.2.2006, p. 1).
- ² Il existe deux numéros CAS pour le chrysotile, comme le confirme l'ECB.
- ³ Règlement (CEE) n° 2658/87 du Conseil du 23 juillet 1987 relatif à la nomenclature tarifaire et statistique et au tarif douanier commun (JO L 256 du 7.9.1987), modifié en dernier lieu par le règlement n° 426/2006 de la Commission (JO L 79 du 16.3.2006, p. 1).
- ⁴ JO L 147 du 9.6.1975, p. 40. Directive modifiée en dernier lieu par le règlement (CE) n° 807/2003 (JO L 122 du 16.5.2003, p. 36).

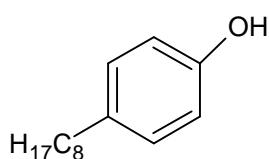
- ¹ Aux fins du présent point, on entend par "article de puériculture" tout produit destiné à faciliter le sommeil, la relaxation, l'hygiène ainsi que l'alimentation et la succion des enfants.

ANNEXE IV

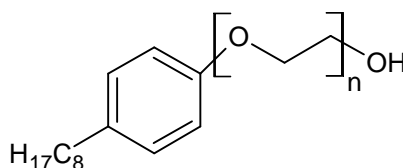
STRUCTURES MOLECULAIRES DES SUBSTANCES CHOISIES

Perturbateurs endocriniens industriels

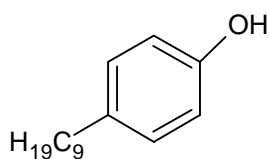
Alkylphénols



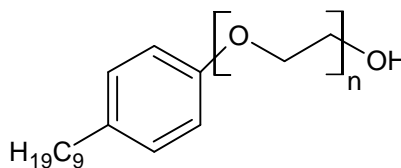
OPs (206,32 g.mol⁻¹)



OPnEOs (n = degrés d'éthoxylation)

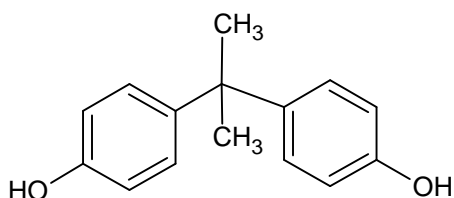


NPs (221,35 g.mol⁻¹)

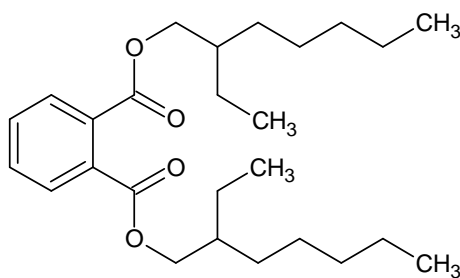


NPnEOs (n = degrés d'éthoxylation)

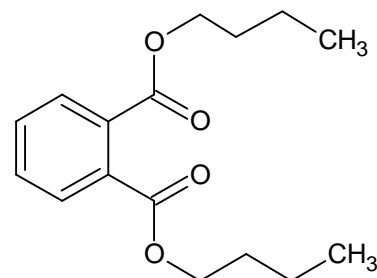
Bisphénol A (228,29 g.mol⁻¹)



Phthalates



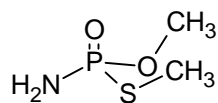
DEHP (390,56 g.mol⁻¹)



DBP (278,35 g.mol⁻¹)

Pesticides

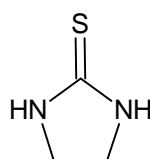
Organophosphorés



Méthamidophos
(141,13 g.mol⁻¹)

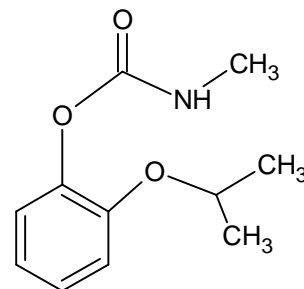
Résidus des EBDC

(EBDC, EthylèneBisDithioCarbamates)

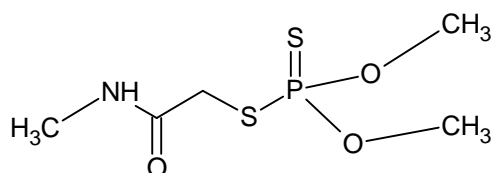


2-imidazolidinethione
(102,16 g.mol⁻¹)

Carbamates

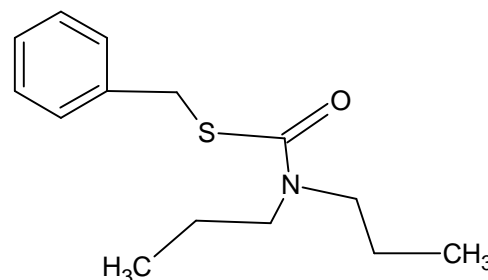


Propoxur (209,24 g.mol⁻¹)



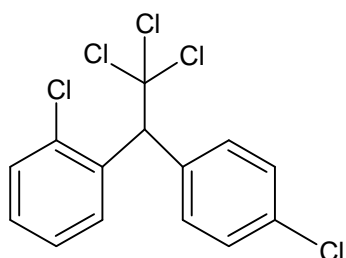
Diméthoate (229,26 g.mol⁻¹)

Thiocarbamates

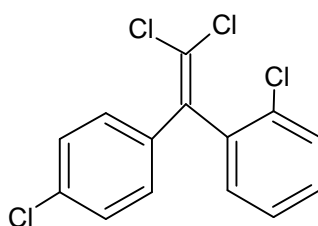


Prosulfocarbe (251,39 g.mol⁻¹)

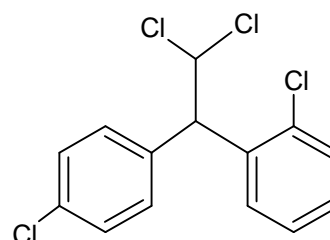
Organochlorés



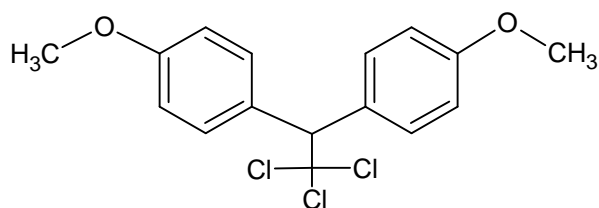
o,p DDT (354,49 g.mol⁻¹)



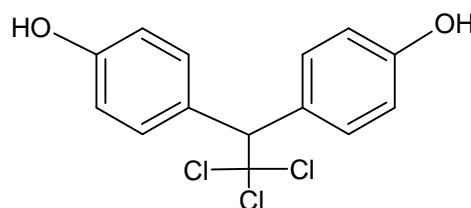
o,p DDE (318,03 g.mol⁻¹)



o,p DDD (320,04 g.mol⁻¹)

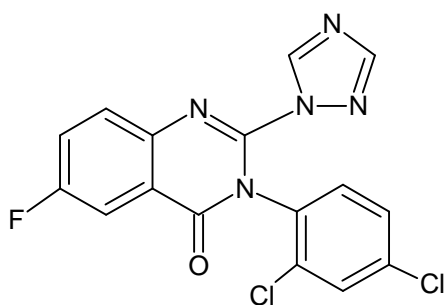


Méthoxychlor (345,65 g.mol⁻¹)

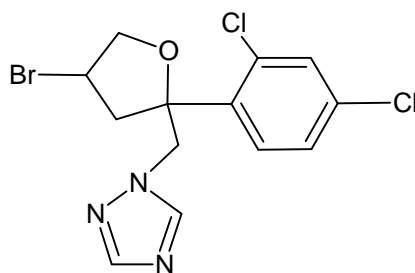


HPTE (317,59 g.mol⁻¹)

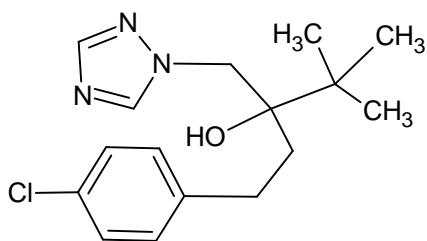
Fongicides



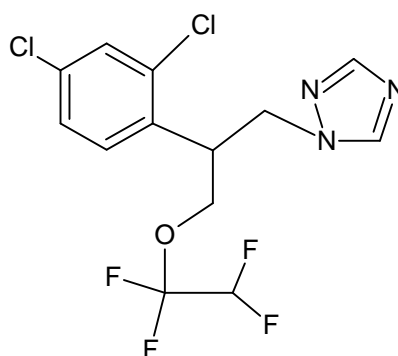
Fluquinconazole (376,17 g.mol⁻¹)



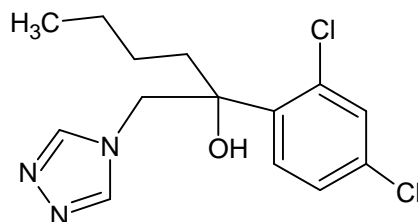
Bromuconazole (377,06 g.mol⁻¹)



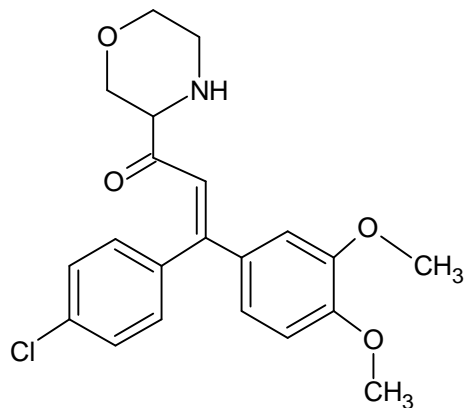
Tébuconazole (307,82 g.mol⁻¹)



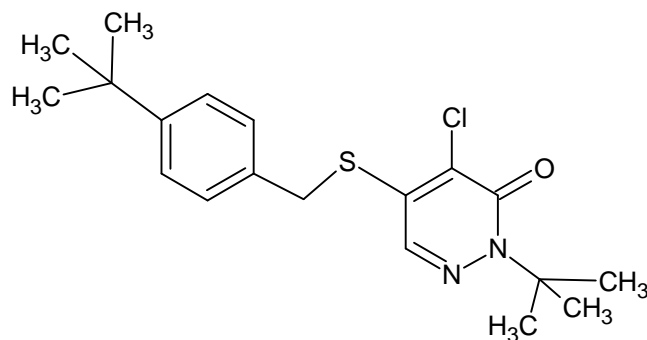
Tétraconazole (372,10 g.mol⁻¹)



Hexaconazole (314,21 g.mol⁻¹)



Diméthomorphe (387,86 g.mol⁻¹)



Pyridabène (364,93 g.mol⁻¹)

ANNEXE V

ACTES CONTRAIGNANTS MENTIONANT LES SUBSTANCES ETUDIÉES

Famille	Produits	CAS	EINECS	Classification [1]	Règlement / Directive / Décision communautaire	
Alkylphénols	Tert-OP	140-66-9	205-426-2	Xn, N; R21-38-41 S26-36	Substance suspectée d'être un perturbateur endocrinien COM (2001) 262 [2]	
	n-OP	1806-26-4	217-302-5	Xi; R36/38 S26-36	Substance inscrite à l'annexe I de la COM (2006) 397, Partie A : Normes de qualité environnementale pour les substances prioritaires dans les eaux de surfaces. Concentration moyenne annuelle fixée à 0,1 µg/L [3]	
	OP ₁ EO	2315-67-5	-	Non évalué	CEPAD, Conseil Européen des Phénols Alkylés et Dérivés – Etude sur la classification et l'étiquetage des substances dangereuses, catégorie 3, toxique pour la Reproduction / Développement / Fertilité [4]	
	OP ₂ EO	2315-61-9	-	Non évalué		
	OP ₃ EO	2315-62-0	-	Non évalué		
	NPs	(mélange d'isomères dont la chaîne alkyle est linéaire)	25154-52-3 NPs	246-672-0	<i>Classification pour le 4-NP :</i> C, N; R22-34-50/53 S26-36/37/39-45-60-61	(CAS :25154-52-3) Substance suspectée d'être un perturbateur endocrinien COM (2001) 262 [2], molécule réglementée par 793/93 (liste 1-4) [5] et inscrite à l'annexe I de la COM (2006) 397, Partie A : Normes de qualité environnementale pour les substances prioritaires dans les eaux de surfaces. Concentration maximale admissible fixée à 2,0 µg/L Concentration moyenne annuelle fixée à 0,3 µg/L [3]
			84852-15-3 4-NP (ramifié)	284-325-5		
			11066-49-2 isoNP	234-284-4		
			90481-04-2	291-844-0		
		NPs ramifié (mélange d'isomères dont la chaîne alkylée est ramifiée)	104-40-5 4n-NP	203-199-4	Tous les NPs cités sont répertoriés sur le règlement 777/2006 sur l'importation et l'exportation des substances dangereuses [6] La directive 1907/2006/CE réglemente la quantité maximale formulée, utilisations précisées en annexe (0,1% en masse) [7]	
104-35-8			-			
20427-84-3			-			
NP ₃ EO	51437-95-7	-	Non évalué	Arrêt d'utilisation dans certains cas par le règlement 2076/2002 [8] Quantité maximale employée réglementée par la directive 1907/2006 (0,1% en masse) [7]		

Famille	Produits	CAS	EINECS	Classification [1]	Règlement / Directive / Décision communautaire
Phtalates - Plastifiants	BA	80-05-7	201-245-8	Xn; R37-41-43-62 S26-36/37/39-46	Substance suspectée d'être un perturbateur endocrinien COM (2001) 262 [2], molécule réglementée par 793/93 (liste 1-4) [5]
	DBP	84-74-2	201-557-4	T, N, Repr. Cat.2 R61-50-62 S53-45-61	Substance suspectée d'être un perturbateur endocrinien COM (2001) 262 [2], molécule réglementée par 793/93 (liste 1-4) [5] Cité sur la directive 1907/2006, substance toxique pour la reproduction catégorie 2 [7]
	DEHP	117-81-7	204-211-0	T, N, Repr. Cat.2 R60-61 S53-45	Substance suspectée d'être un perturbateur endocrinien COM (2001) 262 [2], molécule réglementée par 793/93 (liste 1-4) [5] Cité sur la directive 1907/2006, substance toxique pour la reproduction catégorie 2 [7] Substance inscrite à l'annexe I de la COM (2006) 397, Partie A : Normes de qualité environnementale pour les substances prioritaires dans les eaux de surfaces. Concentration moyenne annuelle fixée à 1,3 µg/L [3] Arrêté de la République Française du 07 décembre 2007 établissant la liste des substances prioritaires ainsi que la liste des substances définies à l'article R 213-48-13 du code de l'environnement relatif à la redevance pour pollutions diffuses (DEHP cité comme substance dangereuse pour l'environnement) [9]

Famille	Produits	CAS	EINECS	Classification [1]	Règlement / Directive / Décision communautaire
Insecticide organophosphorés	Diméthoate	60-51-5	200-480-3	Xn, T, N; R21/22 S36/37	Molécule réglementée par la directive 2007/25 modifiant la directive 91/414/CEE du Conseil en vue d'y inscrire les substances actives diméthoate, diméthomorphe, glufosinate, métribuzine, phosmet et propamocarbe [10] Substance suspectée d'être un perturbateur endocrinien COM (2001) 262 [2] Examen de la substance en Seconde liste des substances prioritaires Règlement 451/2000 [11]
	Méthamidophos	10265-92-6	233-606-0	T+, N; R24-26/28-50 S28-36/37-45-61	Directive 2006/131 modifiant la directive 91/414 en vue d'y inscrire la substance active méthamidophos [12] Arrêté de la République Française du 07 décembre 2007 établissant la liste des substances prioritaires ainsi que la liste des substances définies à l'article R 213-48-13 du code de l'environnement relatif à la redevance pour pollutions diffuses (méthamidophos cité comme substance dangereuse pour l'environnement) [9] Décision de la République Française pour le retrait d'autorisation de mise sur le marché du méthamidophos [13]
Insecticides organochlorés	Méthoxychlore	72-43-5	200-779-9	Xn; R20/21/22-40 S7-23-36/37/39-45	Arrêt d'utilisation dans certains cas par le règlement 2076/2002 [8] Substance suspectée d'être un perturbateur endocrinien COM (2001) 262 [2] Molécule présente sur la liste des substances chimiques prioritaires de l'OSPAR (Convention Oslo-PARIS pour la protection de l'environnement marin de l'Atlantique nord-est) [14]
	HPTE	2971-36-0	-	Xi; R36/37/38 S26-36	Substance suspectée d'être un perturbateur endocrinien COM (2001) 262 [2]

Famille	Produits	CAS	EINECS	Classification [1]	Règlement / Directive / Décision communautaire
Insecticides organochlorés	o,p-DDD	53-19-0	200-166-6	Xn; R40 S36/37	Molécules faisant partie des 12 polluants organiques persistants cités dans la décision 2006/507 relative à la conclusion de la convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants [15] Molécules citées dans les Directive 86/280 et Directive 76/464 [16; 17] Substances suspectées d'être des perturbateurs endocriniens COM (2001) 262 [2]
	p,p-DDD	72-54-8	200-783-0	T, N; R21-25-40-50/53 S36/37-45-60-61	
	o,p-DDE	3424-82-6	-	T; R11-23/24/25 S36/37-45	
	p,p-DDE	72-55-9	200-784-6	Xn, N; R22-40-50/53 S36/37-60-61	
	o,p-DDT	789-02-6	-	T, N; R25-40-48/25-50/53 S36/37-45-60-61	
	p,p-DDT	50-29-3	200-024-3	T, N; R25-40-48/25-50/53 S22-36/37-45-60-61	

Famille	Produits	CAS	EINECS	Classification [1]	Règlement / Directive / Décision communautaire
Fongicide dithiocarbamate	2-Imidazolidinethione	96-45-7	202-506-9	T, N; R22-61 S53-45	Substance classée sur la directive 97/56 comme toxique pour la reproduction catégorie 2 [18] Cité sur la directive 1907/2006, substance mutagène catégorie 1 [7] Substances suspectées d'être des perturbateurs endocriniens COM (2001) 262 [2]
Insecticide carbamate	Propoxur	114-26-1	204-043-8	T, N; R25-50/53 S37-45-60-61	Molécule citée dans le règlement 2076/2002 prolongeant la période visée à l'article 8, paragraphe 2, de la directive 91/414/CEE du Conseil et concernant la non-inclusion de certaines substances actives à l'annexe I de cette directive, ainsi que le retrait des autorisations relatives à des produits phytopharmaceutiques contenant ces substances [8] Substance faisant partie du programme d'examen, citée dans le règlement 1048/2005 [19]
Dés herbant carbamate	Prosulfocarbe	52888-80-9	401-730-6	Xn, N; R22-43-51/53 S24-37-61	Substance réglementée par la directive 2007/76 [20] Arrêté de la République Française du 07 décembre 2007 établissant la liste des substances prioritaires ainsi que la liste des substances définies à l'article R 213-48-13 du code de l'environnement relatif à la redevance pour pollutions diffuses (prosulfocarbe citée comme substance dangereuse pour l'environnement) [9] Etude de risque sanitaire en cours par l'efsa (european food safety authority) [21]

Famille	Produits	CAS	EINECS	Classification [1]	Règlement / Directive / Décision communautaire
Fongicides triazoles	Tébuconazole	107534-96-3	403-640-2	Xn, N, Repr.Cat.3; R22-51/53-63 S22-36/37-61	Arrêté de la République Française du 07 décembre 2007 établissant la liste des substances prioritaires ainsi que la liste des substances définies à l'article R 213-48-13 du code de l'environnement relatif à la redevance pour pollutions diffuses (prosulfoarbe citée comme substance dangereuse pour l'environnement) [9] Substance suspectée d'être des perturbateurs endocriniens COM (2001) 262 [2] Etude de risque sanitaire en cours par l'efsa (european food safety authority) [21]
	Hexaconazole	79983-71-4	413-050-7	Xn, N ; R22-43-51/53 S24-37-61	Arrêté de la République Française du 07 décembre 2007 établissant la liste des substances prioritaires ainsi que la liste des substances définies à l'article R 213-48-13 du code de l'environnement relatif à la redevance pour pollutions diffuses (hexaconazole citée comme substance dangereuse pour l'environnement) [9] Molécule citée dans la COM (2006) 797 concernant la non-inscription de l'hexaconazole à l'annexe I de la directive 91/414/CEE et le retrait des autorisations accordées aux produits phytopharmaceutiques
	Tétraconazole	112281-77-3	407-760-6	Xn, N, Carc.Cat.3; R20/22-40-51-53	Arrêté de la République Française du 07 décembre 2007 établissant la liste des substances prioritaires ainsi que la liste des substances définies à l'article R 213-48-13 du code de l'environnement relatif à la redevance pour pollutions diffuses (tétraconazole citée comme substance dangereuse pour l'environnement) [9] Molécule inscrite à la directive 91/414 [22], en révision actuellement par l'efsa (european food safety authority) [21]
	Fluquinconazole	136426-54-5	411-960-9	T, Xn, Xi, N ; R21-23/25-38-48/25-50-53 S36/37/39-38-45-60-61	Arrêté de la République Française du 07 décembre 2007 établissant la liste des substances prioritaires ainsi que la liste des substances définies à l'article R 213-48-13 du code de l'environnement relatif à la redevance pour pollutions diffuses (fluquinconazole citée comme substance dangereuse pour l'environnement) [9] Etude de risque sanitaire en cours par l'efsa (european food safety authority) [21]
	Bromuconazole	116255-48-2	408-060-3	Xn, N; R22-50/53 S36	Molécule inscrite à la directive 91/414 [22], en révision actuellement par l'efsa (european food safety authority) [21]

Famille	Produits	CAS	EINECS	Classification [1]	Règlement / Directive / Décision communautaire
Fongicide Morpholine	Diméthomorphe	110488-70-5	404-200-2	N; R51-53 S61	Molécule réglementée par la directive 2007/25 modifiant la directive 91/414/CEE du Conseil en vue d'y inscrire les substances actives diméthoate, diméthomorphe, glufosinate, métribuzine, phosmet et propamocarbe [10] Arrêté de la République Française du 07 décembre 2007 établissant la liste des substances prioritaires ainsi que la liste des substances définies à l'article R 213-48-13 du code de l'environnement relatif à la redevance pour pollutions diffuses (diméthomorphe citée comme substance dangereuse pour l'environnement) [9] Etude de risque sanitaire en cours par l'efsa (european food safety authority) [21]
Acaricide Pyridazinone	Pyridabène	96489-71-3	405-700-3	T, N ; R23/25-50/53 S36/37-45-60-61	Arrêté de la République Française du 07 décembre 2007 établissant la liste des substances prioritaires ainsi que la liste des substances définies à l'article R 213-48-13 du code de l'environnement relatif à la redevance pour pollutions diffuses (diméthomorphe citée comme substance dangereuse pour l'environnement) [9] Etude de risque sanitaire en cours par l'efsa (european food safety authority) [21]

NB : Le règlement (CE) 793/93 du 23 mars 1993, concernant l'évaluation et le contrôle des risques présentés par les substances existantes est abrogé avec effet au 1^{er} juin 2008 par le règlement REACH.

Entre 1993 et 2004, 140 substances dangereuses existantes, jugées prioritaires, auraient dû être évaluées par les Etats membres, mais compte tenu des lenteurs administratives et des difficultés rencontrées, seules 27 substances ont pu être évaluées. REACH remplace ce règlement mais les limitations existantes restent en vigueur et sont reprises dans les annexes du règlement REACH.

Bibliographie réglementaire de l'annexe V

1. Sigma-Aldrich (2007).
2. Parlement Européen (14 juin 2001). Communication COM (2001) 262 sur la mise en oeuvre de la stratégie communautaire concernant les perturbateurs endocriniens - une série de substances suspectées d'influer sur le système hormonal des hommes et des animaux (COM (1999) 706).
3. Parlement Européen (17 juillet 2006). Proposition de directive, COM (2006) 397, permettant d'établir des normes de qualité environnementale dans le domaine de l'eau et modifiant la directive 2000/60/CE.
4. CEPAD Conseil Européen des Phénols Alkylés et Dérivés European Council for Alkylphenols and Derivatives. "Position Paper 26th amendment to Council Directive 76/769/EEC EU Consultation Process." disponible à partir de <http://www.cepad.eu/>.
5. Parlement Européen (23 mars 1993). Règlement (CE) N°793/93 du conseil concernant l'évaluation et le contrôle des risques présentés par les substances existantes.
6. Parlement Européen (23 mai 2006). Règlement (CE) N° 777/2006 modifiant l'annexe I du règlement (CE) N° 304/2003 du Parlement européen et du Conseil concernant les exportations et importations de produits chimiques dangereux.
7. Parlement Européen (18 décembre 2006). Règlement (CE) N° 1907/2006 Du Parlement Européen et du Conseil concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), instituant une agence européenne des produits chimiques, modifiant la directive 1999/45/CE et abrogeant le règlement (CE) N° 793/93 du Conseil et le règlement (CE) N° 1 488/94 de la Commission ainsi que la directive 76/769/CE du Conseil et les directives 91/155/CEE, 93/67/CE, 93/105/CE et 2000/21/CE de la Commission. **Regulation No 1907/2006.**
8. Parlement Européen (20 novembre 2002). Règlement (CE) N° 2076/2002 de la Commission prolongeant la période visée à l'article 8, paragraphe 2, de la directive 91/414/CE du Conseil et concernant la non-inclusion de certaines substances actives à l'annexe I de cette directive, ainsi que le retrait des autorisations relatives à des produits phytopharmaceutiques contenant ces substances.
9. République Française (2007). Arrêté du 7 décembre 2007 établissant la liste des substances prioritaires ainsi que la liste des substances définies à l'article R. 213-48-13 du code de l'environnement relatif à la redevance pour pollutions diffuses JORF n°298 du 23 décembre 2007 page 20937 texte n°8 **DEVO0772826A.**
10. Parlement Européen (23 avril 2007). Directive 2007/25/CE modifiant la directive 91/414/CE du Conseil en vue d'y inscrire les substances actives diméthoate, diméthomorphe, glufosinate, métribuzine, phosmet et propamocarbe.
11. Parlement Européen (28 février 2000). Règlement (CE) N° 451/2000 de la Commission établissant les modalités de mise en oeuvre des deuxième et troisième phases du programme de travail visé à l'article 8, paragraphe 2, de la directive 91/414/CE du Conseil.
12. Parlement Européen (11 décembre 2006). Directive 2006/131/CE de la Commission modifiant la directive 91/414/CE du Conseil en vue d'y inscrire la substance active méthamidophos.
13. République Française Ministère de l'agriculture et de la pêche (29 janvier 2008). Communiqué de presse : "Plan ECOPHYTO 2018 : Michel Barnier annonce le retrait de 30 substances".

14. Commission OSPAR pour la protection du milieu marin de l'Atlantique du Nord-Est (2007). Liste OSPAR des produits chimiques devant faire l'objet de mesures prioritaires, OSPAR.
15. Parlement Européen (14 octobre 2004). Décision 2006/507/CE du Conseil concernant la conclusion, au nom de la Communauté européenne, de la convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants.
16. Parlement Européen (12 juin 1986). Directive 86/280/CE du Conseil concernant les valeurs limites et les objectifs de qualité pour les rejets de certaines substances dangereuses relevant de la liste I de l'annexe de la directive 76/464/CE
17. Parlement Européen (4 mai 1976). Directive 76/464/CEE du Conseil concernant la pollution causée par certaines substances dangereuses déversées dans le milieu aquatique de la Communauté.
18. Parlement Européen (20 octobre 1997). Directive 97/56/CE du Parlement Européen et du Conseil portant seizième modification de la directive 76/769/CE concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres relatives à la limitation de la mise sur le marché et de l'emploi de certaines substances et préparations dangereuses
19. Parlement Européen (13 juin 2005). Règlement (CE) N° 1048/2005 de la Commission modifiant le règlement (CE) N° 2032/2003 concernant la seconde phase du programme de travail de dix ans visé à l'article 16, paragraphe 2, de la directive 98/8/CE du Parlement européen et du Conseil concernant la mise sur le marché des produits biocides.
20. Parlement Européen (20 décembre 2007). Directive 2007/76/CE de la commission modifiant la directive 91/414/CEE du Conseil en vue d'y inscrire les substances actives fludioxonyl, clomazone et prosulfocarbe.
21. EFSA European food safety authority. (13 septembre 2006). "List of active substances for which the European Commission has asked the EFSA to perform consumer risk assessment." disponible à partir de http://www.efsa.europa.eu/EFSA/DocumentSet/list_active_substances.0.pdf.
22. Parlement Européen (15 juillet 1991). Directive 91/414/CE concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques.

ANNEXE VI

RECAPITULATIF DES TENEURS RETROUVEES DANS L'ENVIRONNEMENT

Classe chimique - Utilisation	Produits	Teneurs	Matrice aqueuse	Teneurs	Matrice solide
Organophosphorés Insecticide	Diméthoate	0,060 à 0,154 µg.L ⁻¹ [1] 42 ng.L ⁻¹ [2] 15,99 ng.L ⁻¹ [3] 346 ng.L ⁻¹ [4] 12,4 µg.L ⁻¹ [5] 0,268 à 10,90 µg.L ⁻¹ [6] 11 à 3210 ng.L ⁻¹ [7] 22 à 123 ng.L ⁻¹ [8]	Effluents de STEP [1] Eau de rivière [2, 7] Eau d'estuaire [3, 8] Eau de mer [4] Eau de canal [5] Eau souterraine [6]	9,0 à 32,0 µg.kg ⁻¹ [5] 7,1 à 95,5 µg.kg ⁻¹ [9] 1,3 à 2,3 µg.kg ⁻¹ [10]	Terre [5] Terre agricole [9] Sédiments marins [10]
	Méthamidophos	46,43 ng.L ⁻¹ [3]	Eau d'estuaire [3]-	-	-
Dithiocarbamate Fongicides	2-Imidazolidinethione	0,22 à 3,9 µg.L ⁻¹ [11]	Eau souterraine [11]	-	-
Carbamate Insecticide	Propoxur	2,297 à 71 µg.L ⁻¹ [6]	Eau souterraine [6]	-	-
Carbamate Désherbant	Prosulfocarbe	7 à 152 ng.L ⁻¹ [12] 0,3 à 130 µg.L ⁻¹ [13]	Eau de pluie [12, 13]	-	-
Organochlorés Insecticides	Méthoxychlore	0,053 à 0,616 µg.L ⁻¹ [14] 21,6 à 67,3 ng.L ⁻¹ [15] 0,21 à 40,9 ng.L ⁻¹ [16] 0,9 ng.L ⁻¹ [17]	Eau de mer [14, 16] Eau de lac [15] Eau souterraine [17]	35,4 à 352 ng.kg ⁻¹ [15] 0,17 à 0,79 µg.kg ⁻¹ [18] 1 à 1476 ng.kg ⁻¹ [19]	Sédiments de lac [15] Terre [18] Sédiments marins [19]
	HPTE	-	-	-	-
	DDT Total (somme des DDTs, DDEs et DDDs) ^a	6 à 28 ng.L ⁻¹ [7] 4,07 à 29,3 ng.L ⁻¹ [3] 40,61 à 1794 ng.L ⁻¹ [20]	Eau de rivière [7] Eau d'estuaire [3, 20]	10,0 à 32,4 µg.kg ⁻¹ [9] 6,8 à 40,2 µg.kg ⁻¹ [10] 6 à 3897 ng.kg ⁻¹ [19] 1,57 à 13,06 µg.kg ⁻¹ [20]	Terre agricole [9] Sédiments marins [10, 19] Sédiments d'estuaire [20]
Phtalates - Plastifiants	Bisphénol A	0,06 à 1,51 µg.L ⁻¹ [21] 0,018 à 0,702 µg.L ⁻¹ [22] 0,36 à 21,5 µg.L ⁻¹ [23] 6 à 881 ng.L ⁻¹ [24] 3 à 1136 ng.L ⁻¹ [25] 24,6 à 213,6 µg.L ⁻¹ [26] 57 à 1924 ng.L ⁻¹ [27]	Effluents de STEP [21-23, 26] Eau de rivière [24, 26, 27] Eau souterraine [25]	0,004 à 1,363 mg.kg ⁻¹ [28] 2,1 à 118 µg.kg ⁻¹ [29] 6,8 à 22,0 µg.kg ⁻¹ [30] 1,0 à 12,0 µg.kg ⁻¹ [31] 0,25 à 1,00 µg.kg ⁻¹ [32]	Boue de STEP [28, 32] Sédiments marins [29-31]
	Dibutylphtalate	0,29 à 2,78 µg.L ⁻¹ [21] 0,36 à 86 µg.L ⁻¹ [23] 425 µg.L ⁻¹ [33] 83 à 582 ng.L ⁻¹ [34]	Eau de rivière [21] Effluents de STEP [23] Eau de mer [33, 34]	0,006 à 3,7 mg.kg ⁻¹ [35] 0,02 à 0,76 mg.kg ⁻¹ [36]	Boue de STEP [35] Compost-boue [36]
	Diéthylhexylphtalate	0,63 à 2700 µg.L ⁻¹ [23] 550 µg.L ⁻¹ [33] 64 à 463 ng.L ⁻¹ [34]	Effluents de STEP [23, 33] Eau de mer [34]	4,4 à 108 mg.kg ⁻¹ [35] 8,1 à 16 mg.kg ⁻¹ [36] 140 à 512 mg.kg ⁻¹ [37]	Boue de STEP [35, 37] Compost-boue [36]

Classe chimique - Utilisation	Produits	Teneurs	Matrice aqueuse	Teneurs	Matrice solide
Alkylphénols	OP ₁ EO	8,0 à 9,8 µg.L ⁻¹ [38]	Eau souterraine [38]	-	-
	OP ₂ EO	-	-	-	-
	OP ₃ EO	-	-	-	-
	tert- OP	30 à 227 ng.L ⁻¹ [27] 0,10 à 3,98 µg.L ⁻¹ [39]	Eau de rivière [27] Effluents de STEP [39]	105 à 238 µg.kg ⁻¹ [40] 0,22 à 1,25 mg.kg ⁻¹ [41]	Terre amendée de boue de STEP [40] Sédiments de lac [41]
	NP ₁ EO	7,8 µg.L ⁻¹ [42] 0,04 à 0,91 µg.L ⁻¹ [42] 0,7 à 1,8 µg.L ⁻¹ [43]	Eau de rivière [42, 43] Eau souterraine [42]	22,10 à 204,84 mg.kg ⁻¹ [44]	Boue de STEP [44]
	NP ₂ EO	8,4 µg.L ⁻¹ [42] 0,01 à 0,33 µg.L ⁻¹ [42] 1,0 à 4,2 µg.L ⁻¹ [43]	Eau de rivière [42, 43] Eau souterraine [42]	46,79 à 206,69 mg.kg ⁻¹ [44]	Boue de STEP [44]
	NP ₃ EO	-	-	5,13 mg.kg ⁻¹ [45]	Boue de STEP [45]
	NPs [46]	2,7 µg.L ⁻¹ [42] 0,20 à 0,96 µg.L ⁻¹ [42] 36 à 30548 ng.L ⁻¹ [24] 44,2 à 327,3 µg.L ⁻¹ [26] 57 à 227 ng.L ⁻¹ [27] 0,08 à 17,5 µg.L ⁻¹ [39]	Eau de rivière [24, 26, 27, 42] Eau souterraine [42] Effluents de STEP [26, 39]	47 à 192 µg.kg ⁻¹ [29] 76,9 à 664,7 µg.kg ⁻¹ [31] 16,5 à 216,5 µg.kg ⁻¹ [47] 150 à 500 µg.kg ⁻¹ [40]	Sédiments marins [29, 31] Boue de STEP [47] Terre amendée avec boue de STEP [40]
Triazoles Fungicides	Tébuconazole	0,05 à 9,1 µg.L ⁻¹ [48]	Eau de ruissellement [48]	-	-
	Hexaconazole	3,35 µg.L ⁻¹ [49]	Eau agricole [49]	-	-
	Tétraconazole	-	-	-	-
	Fluquiconazole	-	-	-	-
	Bromuconazole	-	-	-	-
Morpholine Fungicide	Diméthomorphe	-	-	-	-
Pyridazinone Acaricide	Pyridabène	-	-	-	-

Bibliographie de l'annexe VI

1. Quintana, J. B., Rodil, R., Muniategui-Lorenzo, S., Lopez-Mahia, P. & Dario, P.-R. (2007). Multiresidue analysis of acidic and polar organic contaminants in water samples by stir-bar sorptive extraction-liquid desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1174, 27-39
2. Kampioti, A., Borba da Cunha, A., Lopez de Alda, M. & Barcelo, D. (2005). Fully automated multianalyte determination of different classes of pesticides, at picogram per litre levels in water, by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382, 1815-1825

3. Zulin, Z., Huasheng, H., Xinhong, W., Jianqing, L., Weiqi, C. & Li, X. (2002). Determination and load of organophosphorus and organochlorine pesticides at water from Jiulong River Estuary, China. *Marine Pollution Bulletin*, 45, 397-402
4. Na, T., Fang, Z., Zhanqi, G., Ming, Z. & Cheng, S. (2006). The status of pesticide residues in the drinking water sources in Meiliangwan Bay, Taihu Lake of China. *Environmental monitoring and assessement*, 123, 351-370
5. El-Kabbany, S., Rashed, M. M. & Zayed, M. A. (2000). Case study : Monitoring of the pesticide levels in some water supplies and agricultural land, in El-Haram, Giza (A.R.E.). *Journal of Hazardous Materials*, A72, 11-21
6. Loewy, M., Kirs, V., Carvajal, G., Venturino, A. & Pechen de D'Angelo, A. M. (1999). Groundwater contamination by azinphos methyl in the Northern Patagonic Region, Argentina. *The Science of the Total Environment*, 225, 211-218
7. Götz, R., Bauer, O. H., Friesel, P. & Roch, K. (1998). Organic trace determination compounds in the water of the river Elbe near Hamburg Part II. 36, 2103-2118
8. Karamfilov, V. K., Fileman, T. W., Evans, K. M. & Mantoura, R. F. C. (1996). Determination of dimethoate and fenitrothion in estuarine samples by C- 18 solid-phase extraction and high-resolution gas-chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *Analytica chimica acta*, 335, 51-61
9. Gonçalves, C. & Alpendurada, M. F. (2005). Assessment of pesticide contamination in soil samples from an intensive horticulture area, using ultrasonic extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Talanta*, 65, 1179-1189
10. Sapozhnikova, Y., Bawardi, O. & Schlenk, D. (2004). Pesticides and PCBs in sediments and fish from the Salton Sea, California, USA. *Chemosphere*, 55, 797-809
11. Meiring, H. D. & de Jong, A. P. J. M. (1994). Determination of ethylenethiourea in water by single-step extractive derivatization and gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 683, 157-165
12. Bernhardt, A. & Ruck, W. (2004). Determination of herbicides in stemflow and throughfall of beeches (*Fagus sylvatica* L.) and in rainfall. *Chemosphere*, 57, 1563-1570
13. Neumann, M., Liess, M. & Schulz, R. (2003). A qualitative sampling method for monitoring water quality in temporary channels or point sources and its application to pesticide contamination. *Chemosphere*, 51, 509-513
14. Basheer, C., Lee Kee, H. & Obbard, P. (2002). Determination of organochlorine pesticides in seawater using liquid-phase hollow fibre membrane microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 968, 191-199
15. Xue, N., Xu, X. & Jin, Z. (2005). Screening 31 endocrine-disrupting pesticides in water and surface sediment samples from Beijing Guanting reservoir. *Chemosphere*, 61, 1594-1606
16. Xu, X., Yang, H., Li, Q., Yang, B., Wang, X. & Lee, F. S. C. (2007). Residues of organochlorine pesticides in near shore waters of LaiZhou Bay and JiaoZhou Bay, Shandong Peninsula, China. *Chemosphere*, 68, 126-139
17. Junior, J. L. R. & Ré-Poppi, N. (2007). Determination of organochlorine pesticides in ground water samples using solid-phase microextraction by gas chromatography-electron capture detection. *Talanta*, 72, 1833-1841

18. Shegunova, P., Klanova, J.& Holoubek, I. (2007). Residues of organochlorinated pesticides in soils from the Czech Republic. *Environmental Pollution*, 146, 257-261
19. de Mora, S., Villeneuve, J.-P., Sheikholeslami, M. R., Cattini, C.& Tolosa, I. (2004). Organochlorinated compounds in Caspian Sea sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 48, 30-43
20. Zhang, Z. L., Hong, H. S., Zhou, J. L., Huang, J.& Yu, G. (2003). Fate and assessment of persistent organic pollutants in water and sediment from Minjiang River Estuary, Southeast China. *Chemosphere*, 52, 1423-1430
21. Céspedes, R., Lacorte, S., Ginebreda, A.& Barcelo, D. (2006). Chemical monitoring and occurrence of alkylphenols, alkylphenol ethoxylates, alcohol ethoxylates, phthalates and benzothiazoles in sewage treatment plants and receiving waters along the Ter river basin (Catalonia, N.E. Spain). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385, 992-1000
22. Fromme, H., Küchler, T., Otto, T., Pilz, K., Müller, J.& Wenzel, A. (2002). Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Research*, 36, 1429-1438
23. Jackson, J.& Sutton, R. (2008). Sources of endocrine-disrupting chemicals in urban wastewater, Oakland, CA. *Science of the Total Environment*, 405, 153-160
24. Peng, X., Yu, Y., Tanga, C., Tana, J., Huang, Q.& Wang, Z. (2008). Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China. *Science of the Total Environment*, 397, 158-166
25. Osenbrück, K., Gläser, H.-R., Knöller, K., Weise, S. M., Möder, M., Wennrich, R., Schirmer, M., Reinstorf, F., Busch, W.& Strauch, G. (2007). Sources and transport of selected organic micropollutants in urban groundwater underlying the city of Halle (Saale), Germany. *Water Research*, 41, 3259-3270
26. Ko, E.-J., Kim, K.-W., Kang, S.-Y., Kim, S.-D., Bang, S.-B., Hamma, S.-Y.& Kim, D.-W. (2007). Monitoring of environmental phenolic endocrine disrupting compounds in treatment effluents and river waters, Korea. *Talanta*, 73, 674-683
27. Quednow, K.& Püttmann, W. (2008). Endocrine disruptors in freshwater streams of Hesse, Germany : Changes in concentration levels in the time span from 2003 to 2005. *Environmental Pollution*, 152, 476-483
28. Gatidou, G., Thomaidis, N., Stasinakis, A.& Lekkas, T. (2007). Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1138, 32-41
29. Pojana, G., Gomiero, A., Jonkers, N.& Marcomini, A. (2007). Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. *Environment International*, 33, 929-936
30. Kitada, Y., Kawahata, H., Suzuki, A.& Oomori, T. (2008). Distribution of pesticides and bisphenol A in sediments collected from rivers adjacent to coral reefs. *Chemosphere*, 71, 2082-2090
31. Peng, X., Wang, Z., Mai, B., Chen, F., Chen, S., Tan, J., Yu, Y., Tang, C., Li, K., Zhang, G.& Yang, C. (2007). Temporal trends of nonylphenol and bisphenol A contamination in the Pearl River Estuary and the adjacent South China Sea recorded by dated sedimentary cores. *Science of the Total Environment*, 384, 393-400

32. Chu, S., Haffner, G. D. & Letcher, R. J. (2005). Simultaneous determination of tetrabromobisphenol A, tetrachlorobisphenol A, bisphenol A and other halogenated analogues in sediment and sludge by high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1097, 25-32
33. Regueiro, J., Llompарт, M., Garcia-Jares, C., Garcia-Monteagudo, J. C. & Celá, R. (2008). Ultrasound-assisted emulsification–microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters. *Journal of Chromatography A*, 1190, 27-38
34. Prieto, A., Zuloaga, O., Usobiaga, A., Etxebarria, N. & Fernandez, L. A. (2007). Development of a stir bar sorptive extraction and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry method for the simultaneous determination of several persistent organic pollutants in water samples. *Journal of Chromatography A*, 1174, 40-49
35. Cai, Q.-Y., Mo, C.-H., Wu, Q.-T., Zeng, Q.-Y. & Katsoyiannis, A. (2007). Occurrence of organic contaminants in sewage sludges from eleven wastewater treatment plants, China. *Chemosphere*, 68, 1751-1762
36. Cai, Q.-Y., Mo, C.-H., Wu, Q.-T., Zeng, Q.-Y. & Katsoyiannis, A. (2007). Quantitative determination of organic priority pollutants in the composts of sewage sludge with rice straw by gas chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1143, 207-214
37. Bago, B., Martín, Y., Mejía, G., Broto-Puig, F., Diaz-Ferrero, J., Agut, M. & Comellas, L. (2005). Di-(2-ethylhexyl)phthalate in sewage sludge and post-treated sludge: Quantitative determination by HRGC-MS and mass spectral characterization. *Chemosphere*, 59, 1191-1195
38. Rudel, R., Melly, S., Geno, P., Sun, G. & Brody, J. (1998). Identification of alkylphenols and other estrogenic phenolic compounds in wastewater, septage, and groundwater on Cape Cod, Massachusetts. *Environmental Science Technology*, 32, 861-869
39. Céspedes, R., Lacorte, S., Ginebreda, A. & Damia, B. (2008). Occurrence and fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates in sewage treatment plants and impact on receiving waters along the Ter River (Catalonia, NE Spain). *Environmental Pollution*, 153, 384-392
40. Andreu, V., Ferrer, E., Rubio, J. L., Font, G. & Pico, Y. (2007). Quantitative determination of octylphenol, nonylphenol, alkylphenol ethoxylates and alcohol ethoxylates by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-mass spectrometry in soils treated with sewage sludges. *Science of the Total Environment*, 378, 124-129
41. Zhang, Z., Wu, Z. & He, L. (2008). The accumulation of alkylphenols in submersed plants in spring in urban lake, China. *Chemosphere*, 73, 859-863
42. Ahel, M., Schaffner, C. & Giger, W. (1996). Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment - III. Occurrence and elimination of their persistent metabolites during infiltration of river water to groundwater. *Water Research*, 30, 37-46
43. Diaz, A., Ventura, F. & Galceran, M.-T. (2002). Simultaneous determination of estrogenic short ethoxy chain nonylphenols and their acidic metabolites in water by an in-sample derivatization/solid-phase microextraction method. *Analytical Chemistry Washington DC*, 74, 3869-3876
44. Aparicio, I., Santos, J. L. & Alonso, E. (2007). Simultaneous sonication-assisted extraction, and determination by gas chromatography–mass spectrometry, of di-(2-ethylhexyl)phthalate,

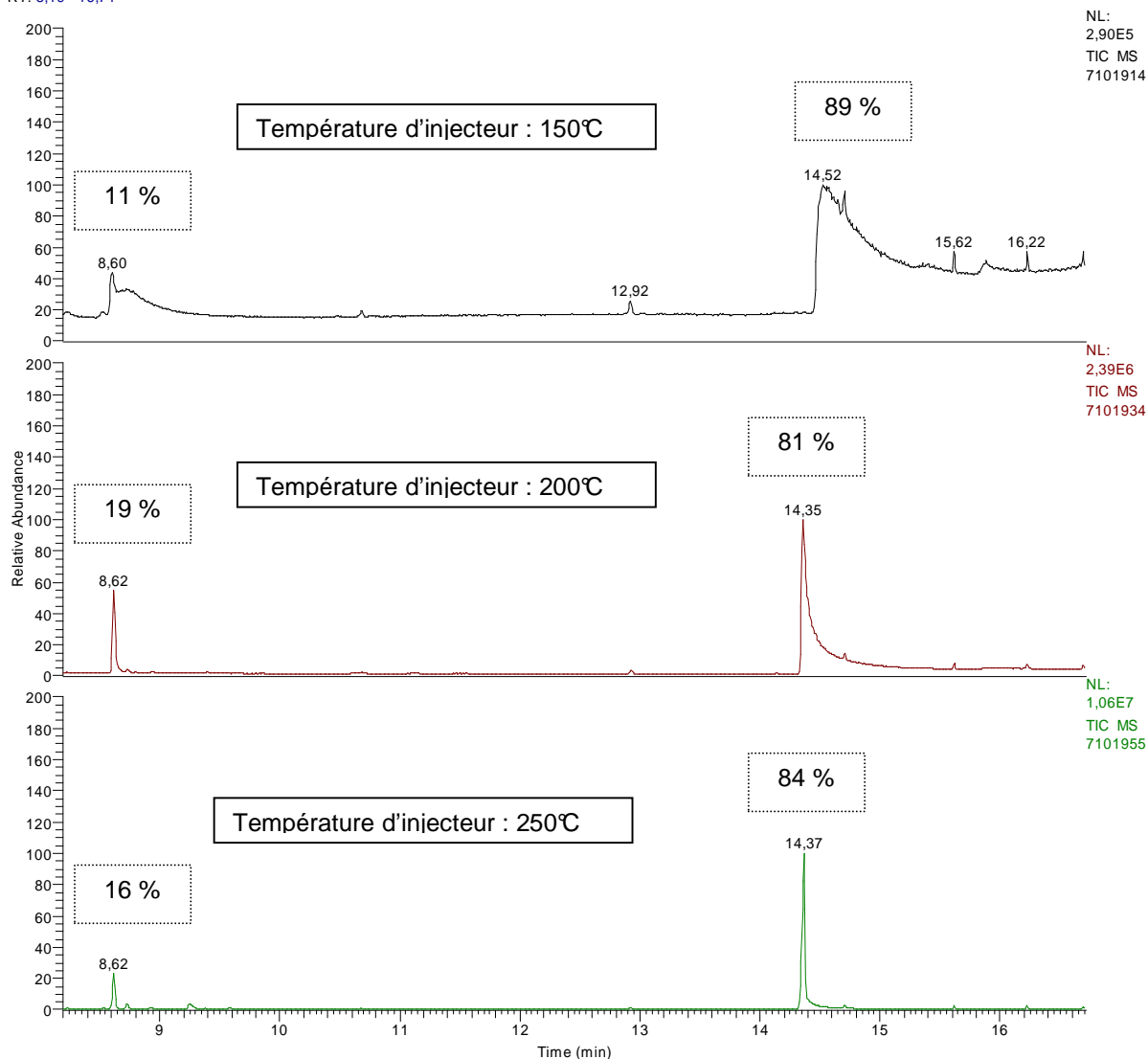
- nonylphenol, nonylphenol ethoxylates and polychlorinated biphenyls in sludge from wastewater treatment plants. *Analytica chimica acta*, 584, 455-461
45. De Voogt, P., De Beer, K. & Van der Wielen, F. (1997). Determination of alkylphenol ethoxylates in industrial and environmental samples. *Trends in analytical chemistry*, 16, 584-595
46. Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E. & Lester, J. N. (2008). Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International*, 34, 1033-1049
47. Ghanem, A., Bados, P., Estaun, A. R., de Alencastro, L. F., Taibi, S., Einhorn, J. & Mougin, C. (2007). Concentrations and specific loads of glyphosate, diuron, atrazine, nonylphenol and metabolites thereof in French urban sewage sludge. *Chemosphere*, 69, 1368-1373
48. Berenzen, N., NLenzen-Godding, A., Probst, M., Schulz, H., Schulz, R. & Liess, M. (2005). A comparison of predicted and measured levels of runoff-related pesticides concentrations in small lowland streams on a landscape level. *Chemosphere*, 58, 683-691
49. Pan, H.-J. & Ho, W.-H. (2004). Determination of fungicides in water using liquid phase microextraction and gas chromatography with electron capture detection. *Analytica chimica acta*, 527, 61-67

ANNEXE VII

CHROMATOGRAMMES D'UNE SOLUTION DE PROPOXUR SOLUBILISE DANS LE THF ET L'ACETATE D'ETHYLE A DIFFERENTES TEMPERATURES D'INJECTEUR

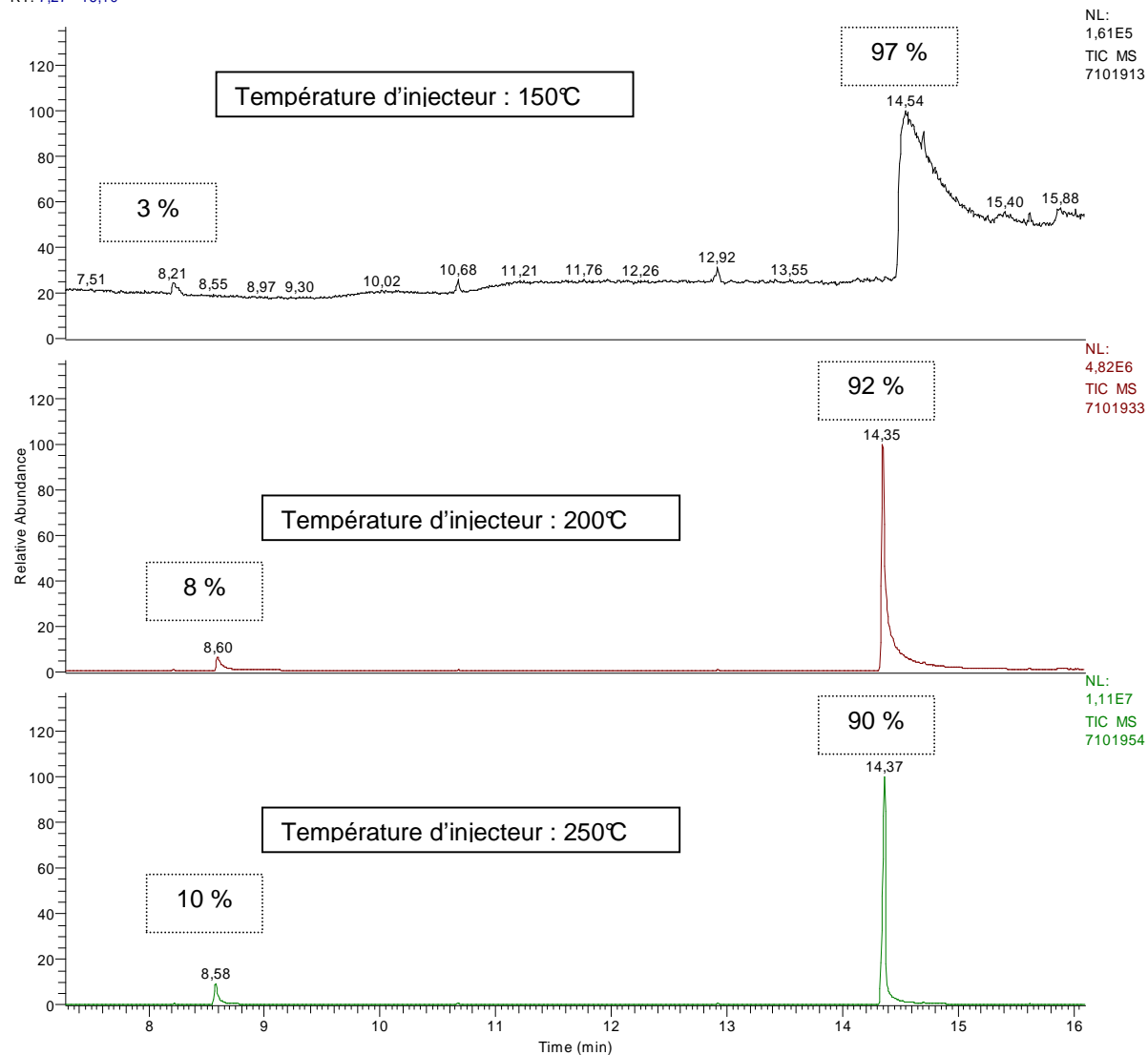
Propoxur dans THF

RT: 8,19 - 16,71



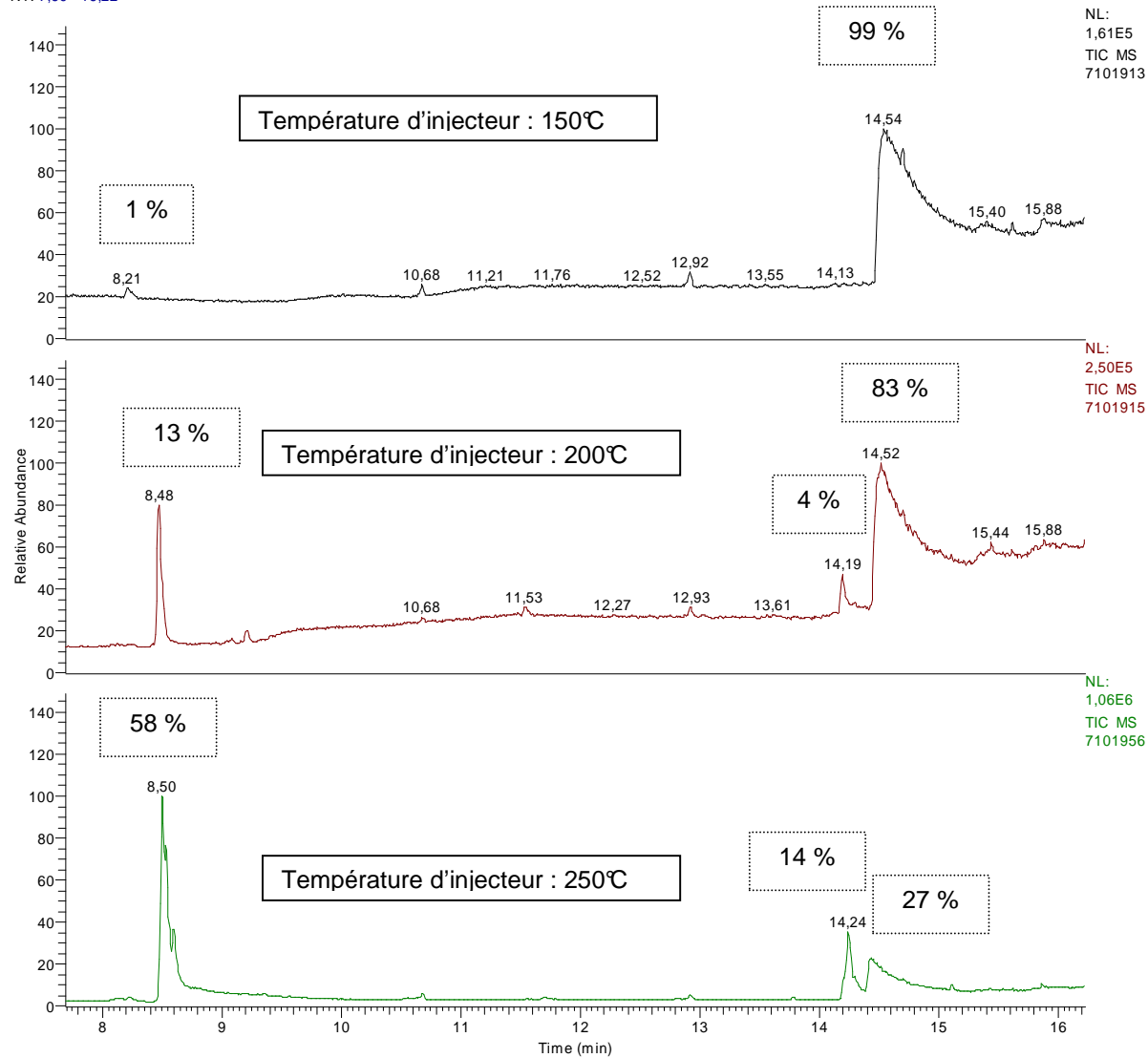
Propoxur dans l'acétate d'éthyle

RT: 7,27 - 16,10



Propoxur dans le méthanol

RT: 7.69 - 16.22



ANNEXE VIII

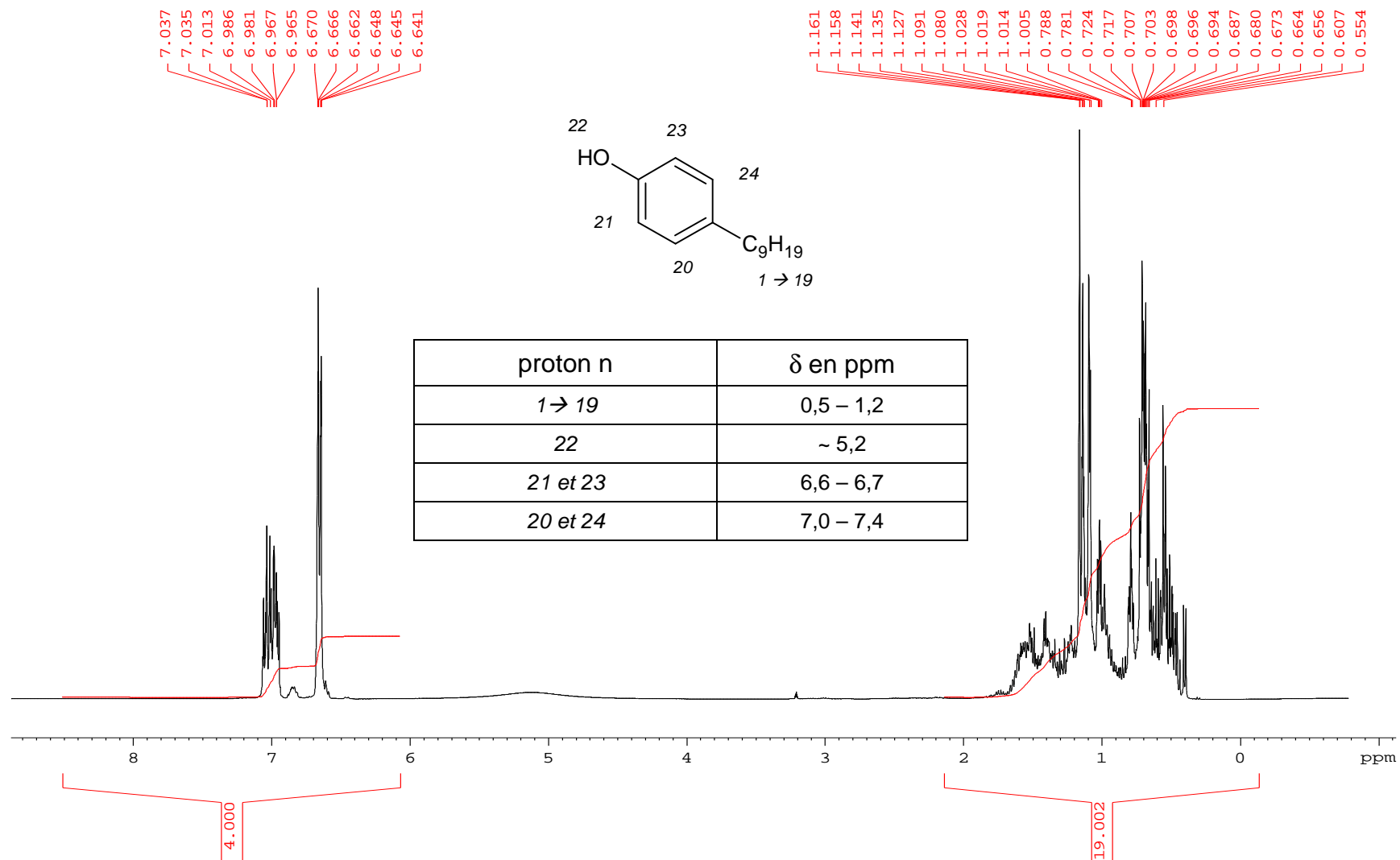
CONDITIONS EXPERIMENTALES D'ANALYSE RMN ET SPECTRES OBTENUS

- Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) :

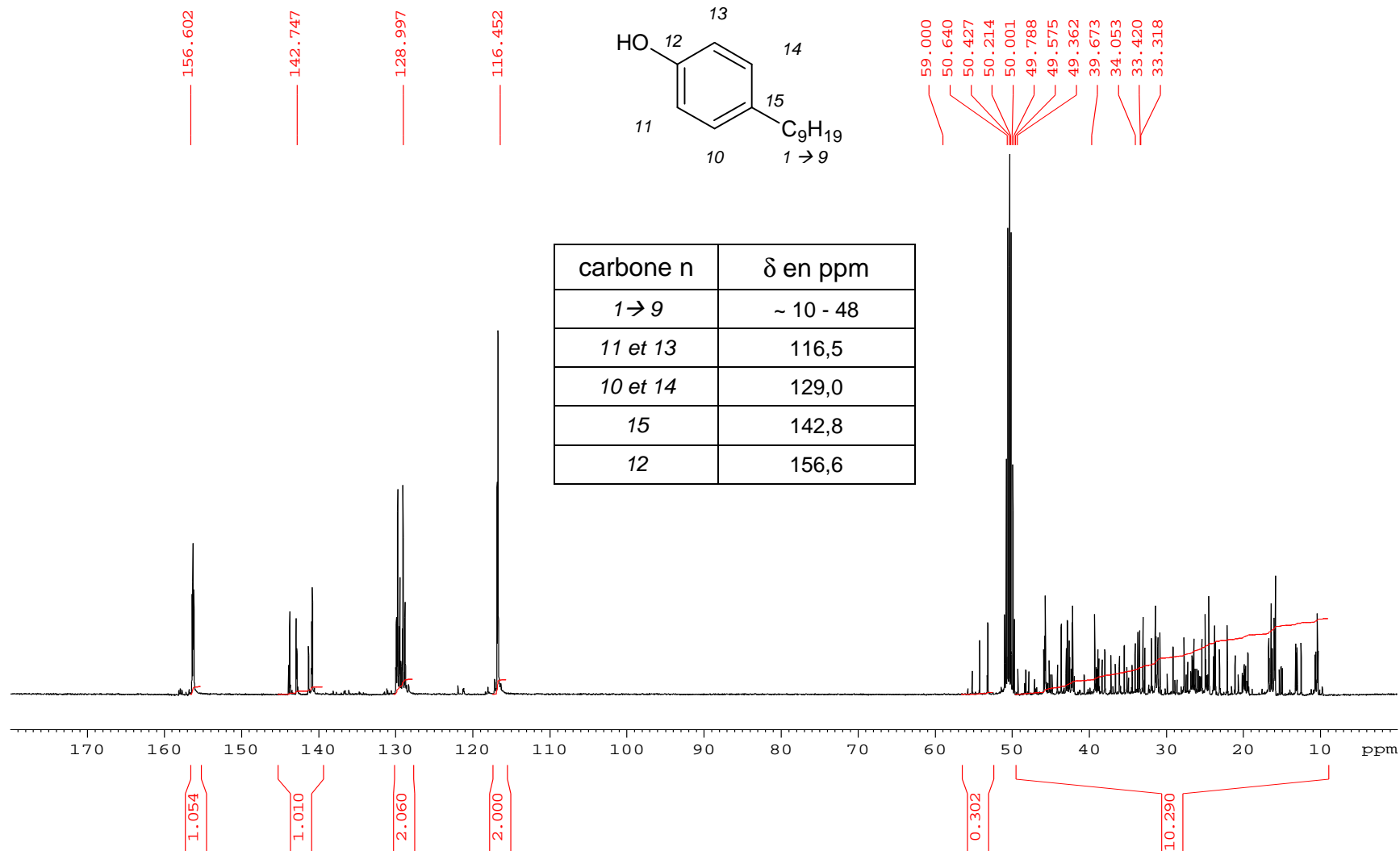
Les expériences de RMN liquide ^1H et ^{13}C ont été effectuées sur un spectromètre BRUKER Advance 400. Le solvant utilisé est le méthanol deutéré, les analyses sont réalisées dans des tubes de 5 mm et une sonde QNP 5 mm, à une température de 30°C. Les paramètres d'acquisition sont les suivants :

	Proton	Carbone 13
<i>Fréquence d'observation</i>	400 MHz	100 MHz
<i>Numérisation du signal (TD)</i>	32 K	131 K
<i>Largeur spectrale (SW)</i>	4789 Hz	19157 Hz
<i>Nombre d'accumulations (NS)</i>	16	1536
<i>Délai d'attente (D_1)</i>	2 s	35 s
<i>Angle d'impulsion (P_1)</i>	10,0 μs (70°)	8,5 μs (70°)
<i>Temps d'acquisition (AQ)</i>	3,42 s	3,42 s

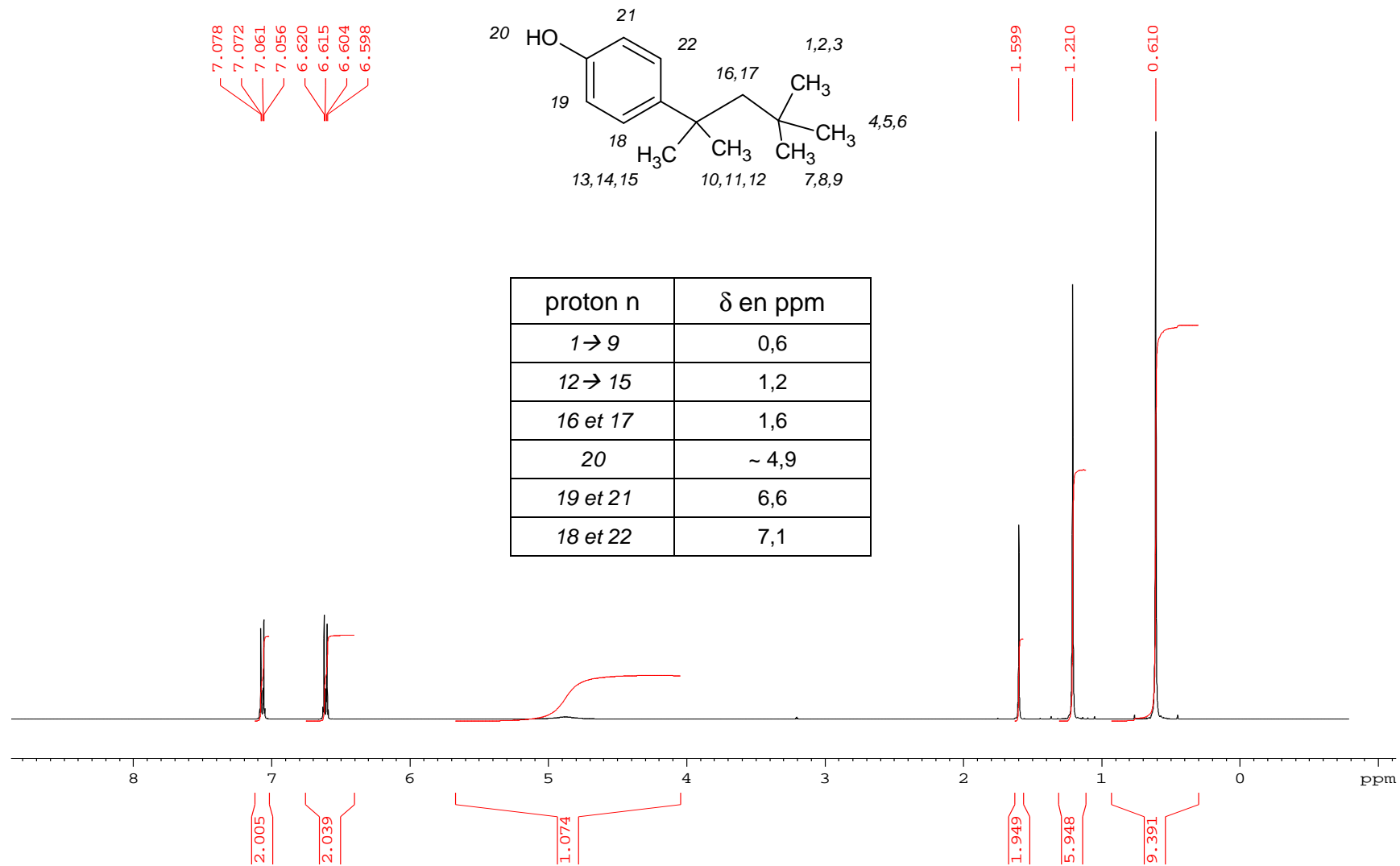
Spectres RMN H¹ du nonylphénol technique



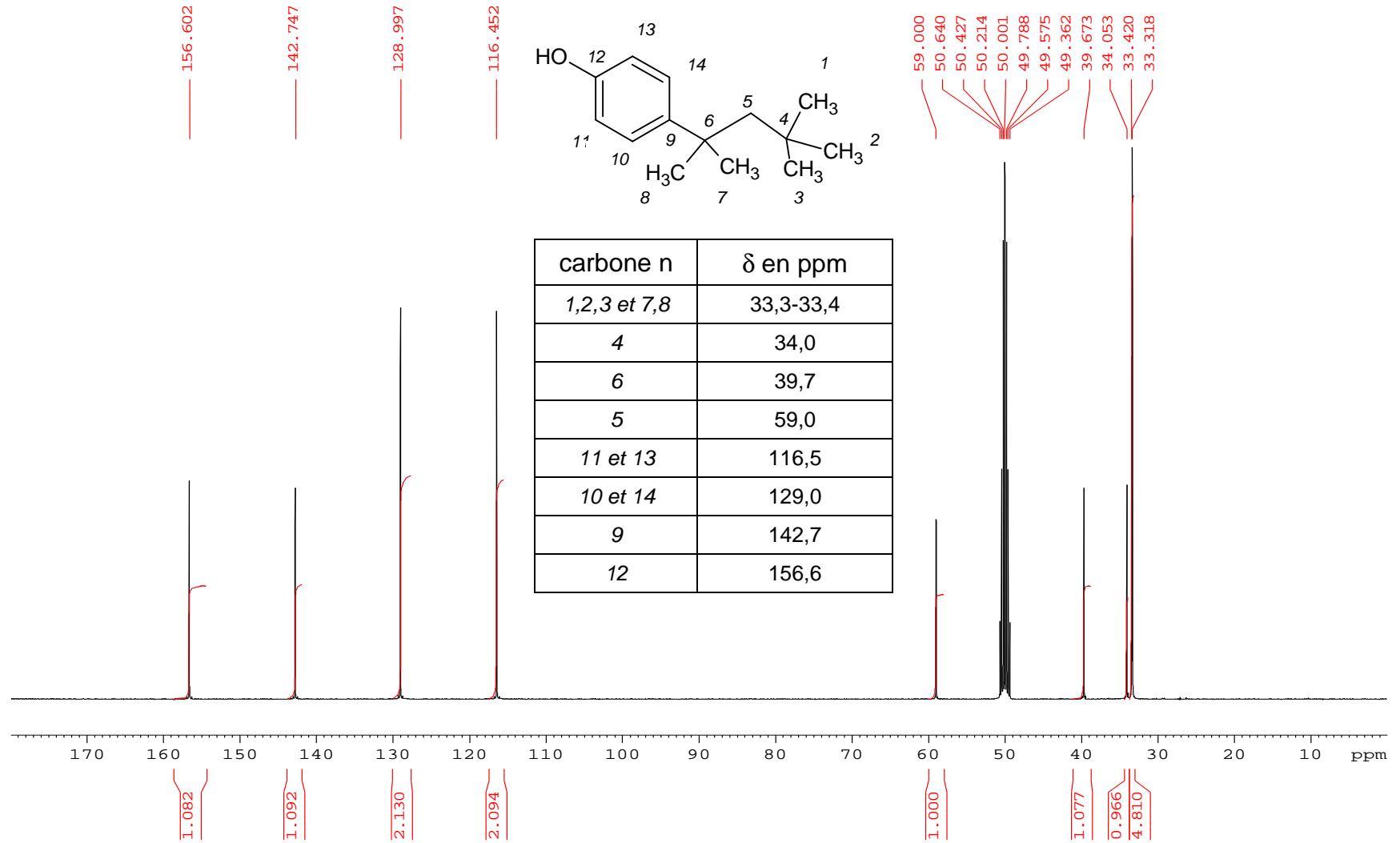
Spectres RMN C¹³ du nonylphénol technique



Spectres RMN H¹ du 4-tert-octylphénol



Spectres RMN C¹³ du 4-tert-octylphéno



ANNEXE IX

CALCUL DE LA RESOLUTION CHROMATOGRAPHIQUE EN CPL EN FONCTION DE LA TEMPERATURE

Température	30°C						40°C						45°C					
	Tr (min)	k	ln k	($\alpha-1$)/ α	k/(k+1)	Rs	Tr (min)	k	ln k	($\alpha-1$)/ α	k/(k+1)	Rs	Tr (min)	k	ln k	($\alpha-1$)/ α	k/(k+1)	Rs
2-imidazolidinethione	1,64	0,09	-2,37	0,364	0,13	1,27	1,61	0,07	-2,61	0,577	0,15	2,33	1,56	0,04	-3,22	0,778	0,15	3,25
Méthamidophos	1,72	0,15	-1,92	0,971	0,84	22,21	1,76	0,17	-1,75	0,965	0,83	21,96	1,77	0,18	-1,71	0,963	0,83	21,87
Diméthoate	9,10	5,07	1,62	0,191	0,86	4,52	8,89	4,93	1,59	0,188	0,86	4,42	8,79	4,86	1,58	0,185	0,86	4,33
Propoxur	10,90	6,27	1,84	0,466	0,92	11,76	10,60	6,07	1,80	0,417	0,91	10,41	10,44	5,96	1,79	0,395	0,91	9,81
Diméthomorphe 1	19,10	11,73	2,46	0,111	0,93	2,82	17,10	10,40	2,34	0,100	0,92	2,53	16,27	9,85	2,29	0,096	0,92	2,40
Diméthomorphe 2	21,29	13,19	2,58	0,069	0,93	1,77	18,84	11,56	2,45	0,069	0,93	1,75	17,83	10,89	2,39	0,068	0,92	1,73
Bromuconazole 1	22,76	14,17	2,65	0,105	0,94	2,70	20,13	12,42	2,52	0,076	0,93	1,93	19,03	11,69	2,46	0,058	0,93	1,46
Fluquinconazole	25,25	15,83	2,76	0,032	0,94	0,82	21,66	13,44	2,60	0,094	0,94	2,40	20,10	12,40	2,52	0,090	0,93	2,30
Tétraconazole	26,03	16,35	2,79	0,025	0,94	0,66	23,74	14,83	2,70	0,081	0,94	2,09	21,94	13,63	2,61	0,101	0,94	2,60
Bromuconazole 2	26,67	16,78	2,82	0,027	0,95	0,70	25,70	16,13	2,78	0,035	0,94	0,92	24,24	15,16	2,72	0,077	0,94	2,00
Tébuconazole	27,37	17,25	2,85	0,019	0,95	0,48	26,59	16,73	2,82	0,017	0,94	0,45	26,15	16,43	2,80	0,018	0,94	0,45
Hexaconazole	27,86	17,57	2,87	0,073	0,95	1,90	27,03	17,02	2,83	0,074	0,95	1,91	26,59	16,73	2,82	0,075	0,95	1,95
Prosulfocarbe	29,94	18,96	2,94	0,025	0,95	0,66	29,06	18,37	2,91	0,015	0,95	0,40	28,63	18,09	2,90	0,012	0,95	0,30
tert-OP	30,68	19,45	2,97	0,043	0,95	1,11	29,49	18,66	2,93	0,038	0,95	0,99	28,95	18,30	2,91	0,037	0,95	0,97
OP ₁ EO	31,98	20,32	3,01	0,020	0,95	0,53	30,60	19,40	2,97	0,020	0,95	0,53	30,01	19,01	2,94	0,019	0,95	0,50
OP ₂ EO	32,61	20,74	3,03	0,016	0,95	0,41	31,20	19,80	2,99	0,015	0,95	0,38	30,57	19,38	2,96	0,015	0,95	0,39
OP ₃ EO	33,10	21,07	3,05	0,037	0,96	0,97	31,64	20,09	3,00	0,026	0,95	0,68	31,01	19,67	2,98	0,021	0,95	0,54
NPs ramifiés	34,31	21,87	3,09	0,046	0,96	1,20	32,45	20,63	3,03	0,036	0,96	0,93	31,63	20,09	3,00	0,031	0,95	0,81
4n-OP	35,88	22,92	3,13	0,007	0,96	0,17	33,59	21,39	3,06	0,012	0,96	0,31	32,59	20,73	3,03	0,014	0,95	0,36
NP ₁ EO	36,11	23,07	3,14	0,024	0,96	0,64	33,97	21,65	3,07	0,024	0,96	0,64	33,03	21,02	3,05	0,024	0,96	0,63
NP ₂ EO	36,97	23,65	3,16	0,016	0,96	0,42	34,78	22,19	3,10	0,017	0,96	0,44	33,81	21,54	3,07	0,017	0,96	0,45
NP ₃ EO	37,54	24,03	3,18	0,020	0,96	0,52	35,35	22,57	3,12	0,059	0,96	1,56	34,37	21,91	3,09	0,055	0,96	1,43
4n-NP	38,26	24,51	3,20	0,003	0,96	0,08	37,48	23,99	3,18	0,012	0,96	0,32	36,27	23,18	3,14	0,035	0,96	0,93
Pyridabène	38,37	24,58	3,20				37,93	24,29	3,19				37,54	24,03	3,18			

Calcul de la résolution chromatographique en CPL en fonction de la température – Coefficients de la loi de Van't Hoff

Température	50°C						60°C						R ²			
	Tr (min)	k	ln k	($\alpha-1$)/ α	k/(k+1)	Rs	Tr (min)	k	ln k	($\alpha-1$)/ α	k/(k+1)	Rs				
Composés																
2-imidazolidiméthione	1,56	0,04	-3,22	0,800	0,17	3,65	1,51	0,00	-5,70	0,984	0,18	4,74		-7,271	164,030	0,6090
Méthamidophos	1,80	0,20	-1,61	0,958	0,83	21,72	1,82	0,21	-1,54	0,954	0,82	21,54		-2,006	-0,087	0,6391
Diméthoate	8,70	4,80	1,57	0,181	0,85	4,23	8,52	4,68	1,54	0,174	0,85	4,05		1,237	-0,202	0,9717
Propoxur	10,29	5,86	1,77	0,374	0,90	9,25	10,00	5,67	1,73	0,333	0,89	8,15		-0,228	1,273	0,9986
Diméthomorphe 1	15,54	9,36	2,24	0,087	0,91	2,17	14,24	8,49	2,14	0,077	0,90	1,91		-3,404	3,192	0,9958
Diméthomorphe 2	16,88	10,25	2,33	0,065	0,92	1,63	15,31	9,21	2,22	0,058	0,91	1,44		-0,165	1,115	0,9999
Bromuconazole 1	17,95	10,97	2,39	0,052	0,92	1,31	16,16	9,77	2,28	0,034	0,91	0,85		-0,010	1,033	0,9996
Fluquinconazole	18,85	11,57	2,45	0,083	0,93	2,11	16,68	10,12	2,31	0,072	0,92	1,81		-0,438	1,205	0,9991
Tétraconazole	20,42	12,61	2,53	0,097	0,93	2,49	17,86	10,91	2,39	0,091	0,92	2,29		0,291	0,915	0,9787
Bromuconazole 2	22,46	13,97	2,64	0,128	0,94	3,29	19,49	11,99	2,48	0,126	0,93	3,21		0,477	0,849	0,9696
Tébuconazole	25,53	16,02	2,77	0,025	0,94	0,65	22,08	13,72	2,62	0,079	0,94	2,02		1,028	0,649	0,9361
Hexaconazole	26,15	16,43	2,80	0,077	0,95	2,01	23,84	14,89	2,70	0,136	0,95	3,53		0,876	0,696	0,9885
Prosulfocarbe	28,22	17,81	2,88	0,008	0,95	0,20	27,37	17,25	2,85	0,002	0,95	0,06		1,390	0,537	0,9078
tert-OP	28,43	17,95	2,89	0,035	0,95	0,92	27,43	17,29	2,85	0,035	0,95	0,91		-0,701	1,247	0,9991
OP ₁ EO	29,42	18,61	2,92	0,019	0,95	0,50	28,37	17,91	2,89	0,018	0,95	0,47		-0,161	1,069	0,9995
OP ₂ EO	29,97	18,98	2,94	0,014	0,95	0,37	28,87	18,25	2,90	0,015	0,95	0,39		-0,029	1,016	1,0000
OP ₃ EO	30,38	19,25	2,96	0,017	0,95	0,45	29,29	18,53	2,92	0,010	0,95	0,27		0,003	1,004	0,9999
NPs ramifiés	30,89	19,59	2,98	0,026	0,95	0,69	29,58	18,72	2,93	0,021	0,95	0,54		-0,611	1,212	0,9997
4n-OP	31,69	20,13	3,00	0,019	0,95	0,48	30,18	19,12	2,95	0,018	0,95	0,46		-0,469	1,167	0,9999
NP ₁ EO	32,26	20,51	3,02	0,020	0,95	0,52	30,70	19,47	2,97	0,021	0,95	0,55		0,222	0,931	0,9994
NP ₂ EO	32,89	20,93	3,04	0,018	0,96	0,46	31,33	19,89	2,99	0,014	0,95	0,36		-0,051	1,024	0,9995
NP ₃ EO	33,45	21,30	3,06	0,043	0,96	1,12	31,75	20,17	3,00	0,031	0,95	0,81		-0,008	1,008	0,9996
4n-NP	34,88	22,25	3,10	0,051	0,96	1,34	32,72	20,81	3,04	0,052	0,96	1,37		0,165	0,960	0,9322
Pyridabène	36,68	23,45	3,16				34,44	21,96	3,09					1,050	0,675	0,9571

ANNEXE X

CARACTERISTIQUES DES SOLVANTS EMPLOYES [1, 2]

Solvant	Indice de polarité	Force éluante	Viscosité (cp)	limite UV (nm)	Température d'ébullition (°C)	Tension de vapeur (mm Hg à 20°C)	Densité
Cyclohexane	0,04	-0,2	0,894	200	81	77,0	0,774
n-Hexane	0,1	0,01	0,300	195	69	127,5	0,659
n-Heptane	0,2	0,02	0,387	200	98	40,0	0,684
Dichlorométhane	3,1	0,42	0,413	233	40	349,0	1,327
Tétrahydrofuran	4,2	0,45	0,456	238	66	143,0	0,881
Acétone	5,4	0,56	0,306	330	56	180,0	0,791
Acétate d'éthyle	4,3	0,58	0,426	255	77	73,0	0,900
Propan-2-ol	4,3	0,63	2,04	210	82	33,0	0,780
Acétonitrile	6,2	0,65	0,369	190	82	73,0	0,786
Ethanol	4,3	0,88	1,074	207	78,5	44,0	0,790
Méthanol	6,6	0,95	0,504	210	65	92,3	0,791
Eau	10,2	élevé	0,890	190	100	17,5	1,000

1. Mendham, J., Denney, R. C., Barnes, J. & Thomas, M. (2005). *Analyse chimique quantitative de Vogel De Boeck*.
2. Lide, D. R. (2006-2007). *Handbook of chemistry and physics* 87th Edition.

ANNEXE XI

ETUDE STATISTIQUE DE LA REGRESSION LINEAIRE SUR LES EXTRAITS AQUEUX

Composé	Carbamate et résidu			Organophosphorés		
	2-imidazolidinethione	Propoxur	Prosulfocarbe	Méthamidophos	Diméthoate	
a	1833,66	610046,09	242769,73	58416,04	222242,99	
Ecart type sur a	18,73	9005,60	2967,80	370,04	2978,13	
b	1113,25	46997,02	56238,88	-2923,37	23676,60	
Ecart type sur b	97,98	10759,17	5563,49	392,64	2816,44	
Coefficient de corrélation R ²	0,996	0,992	0,994	0,998	0,993	
SCE régression	669456299	3863447662346	1505776356291	27940678937	321286805950	
SCE résiduelle	2221279	26559991506	7631269460	35836317	1828724745	
Variance résiduelle	63465	758856900	218036270	1023895	52249278	
F régression	10548,4	5091,1	6906,1	27288,6	6149,1	
SCE erreur de modèle	431639	5433264424	919872308	6767706	363607208	
Variance erreur de modèle	143880	1811088141	306624103	2255902	121202403	
F modèle	2,267	2,387	1,406	2,203	2,320	
Equation 1	0,977	2,253	6,754	5,560	1,098	
Equation 2	0,249	0,095	0,054	0,018	0,078	

Composé	Fongicides						Acaricide
	Diméthomorphe	Bromuconazole	Fluquinconazole	Tétraconazole	Tébuconazole	Hexaconazole	
a	246984,27	407565,46	343912,28	14994,72	961003,57	370400,61	764793,21
Ecart type sur a	1693,94	2317,24	2517,65	177,87	13924,45	1310,10	9202,70
b	47228,54	21147,56	10794,25	2347,41	213604,38	109295,23	195135,83
Ecart type sur b	2040,73	2757,53	2903,32	330,83	21017,50	2326,12	11070,02
Coefficient de corrélation R ²	0,998	0,999	0,998	0,995	0,992	1,000	0,995
SCE régression	641917522859	1710762026751	1143917586471	5656952934	15302192485194	3145639825787	6154960245469
SCE résiduelle	1026230535	1789143416	1985974153	24902579	101895510146	1229944352	28281388205
Variance résiduelle	29320872	51118383	56742119	711502	2911300290	35141267	808039663
F régression	21892,9	33466,7	20159,9	7950,7	5256,1	89514,1	7617,2
SCE erreur de modèle	121187639	312312766	343576157	5345041	20184086034	265465115	5583631113
Variance erreur de modèle	40395880	104104255	114525386	1781680	6728028678	88488372	1861210371
F modèle	1,378	2,037	2,018	2,504	2,311	2,518	2,303
Equation 1	2,712	9,438	8,980	6,847	4,822	3,547	9,914
Equation 2	0,029	0,024	0,039	0,055	0,027	0,067	0,036

Alkylphénols									
Composé	tert-OP	4n-OP	OP ₁ EO	OP ₂ EO	NP ramifiés	4n-NP	NP ₁ EO	NP ₂ EO	
a	3080,50	10623,00	34880,75	114445,68	361366,66	113467,16	27919,59	113035,80	
Ecart type sur a	38,62	146,04	431,54	1078,39	6088,87	1228,51	357,45	1076,29	
b	663,17	690,07	3277,86	5256,23	137915,73	5668,73	1227,06	9864,08	
Ecart type sur b	46,78	176,90	522,73	411,21	84568,66	468,45	196,73	545,92	
Coefficient de corrélation R ²	0,994	0,993	0,994	0,997	0,994	0,996	0,994	0,997	
SCE régression	101261155	1204187657	1298288556	13850155348	114982426318988	13614328304	1717139873	23907285089	
SCE résiduelle	491197	7587571	62009275	33184335	560890172219	50716335	8822469	58760910	
Variance résiduelle	14034	216788	1771694	1659217	28044508611	1449038	441123	2938045	
F régression	7215,3	5554,7	7328,0	8347,4	4100,0	9395,4	3892,7	8137,1	
SCE erreur de modèle	113460	1061102	13505157	13545077	189931460349	9928821	1873134	23603043	
Variance erreur de modèle	37820	353701	4501719	4515026	63310486783	3309607	624378	7867681	
F modèle	2,695	1,632	2,541	2,721	2,258	2,284	1,415	2,678	
Equation 1	9,431	5,444	0,400	1,689	6,556	9,684	8,664	1,019	
Equation 2	0,429	0,249	0,004	0,018	0,175	0,566	0,038	0,043	

ANNEXE XII

RESULTATS (EN PPB) OBTENUS SUR LES EFFLUENTS DE STEP, L'EAU DU ROBINET (POTABLE) ET L'EAU

INDUSTRIELLE

Composés	Effluent 01/03/2007	Effluent 20/03/2007	Effluent 23/04/2007	Effluent 30/05/2007	Effluent 09/07/2007	Eau du robinet	Eau industrielle
NPs	d	d	nd	nd	d	nd	nd
OPs	d	d	nd	nd	d	nd	nd
OP ₁ EO	nd	0,34	1,73	d	nd	nd	nd
OP ₂ EO	0,71	1,25	0,25	d	d	d	d
OP ₃ EO	d	d	d	d	d	d	d
NP ₁ EO	1,68	0,76	13,2	0,163	d	d	d
NP ₂ EO	0,91	0,88	6,4	0,35	d	nd	nd
NP ₃ EO	d	d	d	d	d	d	d
Diocetylphthalate	415	d	7,8	d	d	d	d
Dibutylphthalate	645	d	d	d	d	9,6	d
Bisphénol A	208	d	d	d	d	d	d
Diméthoate	d	d	nd	d	d	nd	nd
Méthamidophos	nd	nd	nd	10,9	d	nd	nd
2-Imidazolidinethione	nd	nd	nd	2,3	d	nd	nd
Propoxur	d	d	0,090	d	d	nd	nd
Prosulfocarbe	d	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Méthoxychlore	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
HPTE	d	nd	nd	nd	d	nd	nd
o,p-DDD	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
p,p-DDD	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
o,p-DDE	9,6	nd	nd	nd	nd	nd	nd
p,p-DDE	d	nd	nd	nd	nd	nd	nd
o,p-DDT	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
p,p-DDT	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Tébuconazole	d	d	0,043	d	d	d	d
Hexaconazole	d	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Tétraconazole	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Fluquiconazole	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Bromuconazole	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Diméthomorphe	nd	nd	nd	d	d	nd	nd
Pyridabène	nd	d	nd	nd	nd	nd	nd

RESULTATS (EN PPB) OBTENUS SUR DES EAUX REELLES PRELEVEES DANS LE CADRE D'UN

PROGRAMME DE LA DRASS

Composés	Eau souterraine 1	Eau souterraine 2	Eau souterraine 3	Eau de surface 1	Eau de surface 2	Rhône (Ternay)	Eau de pluie	Eau traitée 1	Eau traitée 2
NP	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
OP	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
OP ₁ EO	d	d	d	d	d	d	d	d	d
OP ₂ EO	d	0,133	d	d	d	d	d	d	d
OP ₃ EO	d	d	d	d	d	d	nd	d	d
NP ₁ EO	d	0,098	d	1,01	d	d	d	d	d
NP ₂ EO	d	0,21	0,091	1,41	0,073	0,055	d	0,130	0,087
NP ₃ EO	d	d	d	d	d	d	d	d	d
Dioctylphthalate	6,9	d	d	6,2	d	10,9	d	d	d
Dibutylphthalate	d	d	d	d	d	13,8	nd	d	d
Bisphénol A	d	d	d	d	d	nd	nd	d	d
Diméthoate	nd	nd	nd	nd	nd	d	d	nd	nd
Méthamidophos	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2-Imidazolidinethione	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Propoxur	nd	nd	nd	nd	nd	d	d	nd	nd
Prosilfocarbe	nd	nd	nd	nd	nd	d	nd	nd	nd
Méthoxychlore	nd	d	d	d	d	nd	nd	nd	d
HPTE	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
o,p-DDD	d	d	d	d	d	nd	nd	d	d
p,p-DDD	d	nd	d	d	d	nd	nd	nd	nd
o,p-DDE	d	d	nd	d	d	nd	nd	d	d
p,p-DDE	d	d	d	d	d	nd	nd	d	d
o,p-DDT	d	nd	nd	d	nd	nd	nd	nd	nd
p,p-DDT	d	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Tébuconazole	nd	0,89	0,033	0,029	0,030	d	d	d	0,032
Hexaconazole	nd	nd	nd	nd	nd	d	d	nd	nd
Tétraconazole	nd	nd	nd	nd	nd	d	nd	nd	nd
Fluiconazole	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Bromuconazole	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Diméthormorphe	nd	nd	nd	nd	nd	d	d	nd	nd
Pyridabène	nd	nd	nd	nd	nd	d	d	nd	nd

d, détecté ; nd, non détecté

ANNEXE XIII

CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES MOLECULES RECHERCHEES LORS DE L'OPTIMISATION DU PROTOCOLE D'ANALYSE DES MATRICES SOLIDES

Classe chimique - Utilisation	Produits	MM (g.mol ⁻¹)	CAS	Longueur d'onde d'absorption maximale (nm)	Point fusion - point d'ébullition	log Kow	Solubilité (eau)
Organophosphorés Insecticide	Diméthoate	229,28	60-51-5	254	52 - 107 °C 0,05 mm Hg	0,78	25 g/L (21°C)
	Méthamidophos	141,1	10265-92-6	254	46 - / °C	- 0,80	1000 g/L (20°C)
Dithiocarbamate Fongicides	2-Imidazolidinethione	102,15	96-45-7	256	203 - 347,18 °C	-0,66	20 g/L (30°C)
Carbamate Insecticide	Propoxur	209,25	114-26-1	270	91 - / °C	1,52	1860 mg/L (20°C)
Organochlorés Insecticides	Méthoxychlore	345,65	72-43-5	252	87 - 346 °C	5,08	0,1 mg/L (25°C)
	HPTE	317,59	2971-36-0	250	/ - /	4,55	4,83 mg/L (25°C)
	o,p-DDD	320,05	53-19-0	250	77 - / °C	5,87	0,1 mg/L (25°C)
	p,p-DDD	320,05	72-54-8		109,5 - 350 °C	6,02	0,09 mg/L (25°C)
	o,p-DDE	318,03	3424-82-6		/ - /	6,00	0,14 mg/L (25°C)
	p,p-DDE	318,03	72-55-9		89 - 336 °C	6,51	0,04 mg/L (25°C)
	o,p-DDT	354,51	789-02-6		/ - /	6,79	0,085 mg/L (25°C)
	p,p-DDT	354,51	50-29-3		108,5 - / °C	6,91	0,0055 mg/L (25°C)

Classe chimique - Utilisation	Produits	MM (g.mol ⁻¹)	CAS	Longueur d'onde d'absorption maximale (nm)	Point fusion - point ébullition	log Kow	Solubilité (eau)
Phtalates - Plastifiants	Bisphenol A	228,29	80-05-7	280	153 - 220 °C 4 mm Hg	3,32	120 mg/L (25°C)
	Dibutylphtalate	278,35	84-74-2	275	-35 - 340 °C	4,50	11,2 mg/L (25°C)
	Diéthylhexylphtalate	390,56	117-81-7		-55 - 384 °C	7,60	0,27 mg/L (25°C)
Alkylphénols [1]	OP ₁ EO	250,38	-	278		4,10	8,0 mg/L (20°C)
	OP ₂ EO	294,44	-			4,00	13,2 mg/L (20°C)
	OP ₃ EO	338,4	-			3,90	18,4 mg/L (20°C)
	OP	206,33	27193-28-8		/ - /	4,12	12,6 mg/L (20°C)
	NP ₁ EO	264,41	104-35-8			4,17	3,02 mg/L (20°C)
	NP ₂ EO	308,46	20427-84-3			4,21	3,38 mg/L (20°C)
	NP ₃ EO	352,4	-			4,20	5,88 mg/L (20°C)
	NP	220,35	25154-52-3		/ - 293-297 °C	4,48	6,35 mg/L (25°C)
Triazoles Fungicides	Tébuconazole	307,80	107534-96-3	270	102,4 - / °C	3,70	36 mg/L (20°C)
	Hexaconazole	314,20	79983-71-4	268	111 - / °C	3,90	17 mg/L (20°C)
	Tétraconazole	372,10	112281-77-3	268	6 - / °C	3,56	156 mg/L (20°C)
	Fluquiconazole	376,20	136426-54-5	275	192 - / °C	3,24	1 mg/L (20°C)
	Bromuconazole	377,10	116255-48-2	250	84 - / °C	3,24	50 mg/L (25°C)
Carbamate Dés herbant	Prosulfocarbe	251,39	52888-80-9	250	< 25 - 129 °C (0,25 mm Hg)	4,65	13,2 mg/L (20°C)
Morpholine Fungicide	Diméthomorphe	387,90	110488-70-5	253	148 - / °C	2,68	18,7 mg/L (25°C)
Pyridazinone Acaricide	Pyridabène	364,90	96489-71-3	295	111,5 - / °C	6,37	0,012 mg/L (20°C)

1. Ying, G.-G., Williams, B. & Kookana, R. (2002). Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates - a review. *Environmental International*, 28, 215-226

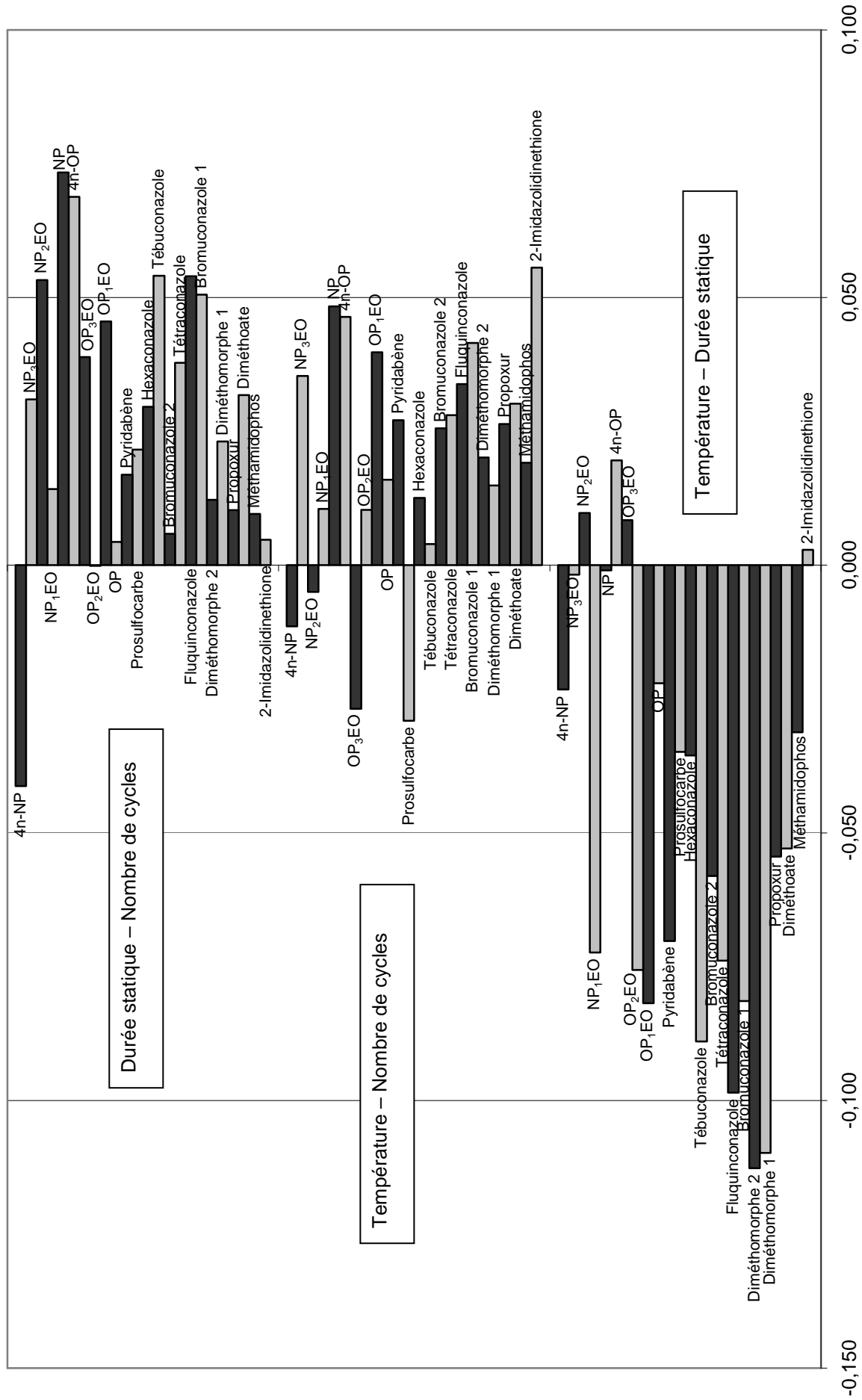
ANNEXE XIV

TAUX DE RECUPERATION CALCULES A PARTIR DU PLAN D'EXPERIENCES DE L'EXTRACTION DES BOUES

A PARTIR D'UNE PLE

Composé \ Essai	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	RSD de l'expérience au centre
2-Imidazolidinethione	104%	92%	98%	79%	90%	94%	97%	97%	69%	57%	94%	83%	67%	77%	76%	95%	84%	77%	68%	73%	7%
Méthamidophos	89%	78%	81%	92%	96%	59%	72%	87%	71%	60%	92%	83%	69%	81%	84%	62%	86%	93%	71%	81%	9%
Diméthoate	85%	52%	78%	69%	76%	50%	56%	77%	57%	41%	87%	85%	70%	81%	79%	64%	63%	70%	72%	66%	4%
Propoxur	97%	61%	81%	83%	88%	63%	73%	92%	67%	48%	100%	94%	77%	91%	88%	64%	71%	84%	81%	63%	9%
Diméthomorphe 1	90%	55%	107%	93%	107%	60%	71%	98%	72%	40%	98%	115%	75%	112%	86%	81%	83%	88%	85%	82%	3%
Diméthomorphe 2	87%	55%	109%	90%	98%	64%	74%	87%	67%	51%	113%	111%	86%	94%	91%	72%	71%	87%	92%	89%	9%
Bromuconazole 1	97%	88%	102%	90%	97%	69%	68%	97%	74%	53%	108%	116%	90%	115%	105%	75%	93%	80%	94%	86%	7%
Fluquinconazole	99%	76%	99%	90%	97%	66%	65%	89%	66%	50%	97%	115%	92%	111%	99%	66%	80%	81%	90%	75%	6%
Tetraconazole	116%	76%	107%	90%	103%	75%	72%	97%	76%	58%	100%	107%	85%	111%	91%	74%	81%	89%	84%	109%	12%
Bromuconazole 2	109%	79%	100%	98%	109%	79%	82%	108%	81%	70%	110%	109%	100%	94%	110%	68%	79%	95%	89%	100%	9%
Tébuconazole	100%	80%	110%	96%	96%	70%	70%	92%	68%	48%	98%	89%	114%	72%	108%	36%	94%	84%	72%	112%	17%
Hexaconazole	90%	78%	97%	89%	96%	70%	73%	93%	77%	57%	103%	69%	94%	73%	103%	64%	79%	95%	64%	81%	13%
Prosulfocarbe	91%	81%	104%	90%	100%	87%	76%	90%	105%	74%	108%	54%	93%	104%	94%	73%	78%	98%	87%	99%	10%
OP	108%	96%	107%	92%	106%	108%	92%	109%	97%	84%	100%	99%	106%	99%	104%	90%	82%	103%	91%	72%	13%
OP1EO	101%	80%	108%	96%	100%	102%	76%	84%	82%	75%	108%	105%	105%	110%	102%	102%	73%	99%	93%	99%	12%
OP2EO	94%	76%	106%	89%	98%	93%	76%	100%	98%	67%	108%	111%	102%	104%	91%	88%	73%	79%	91%	96%	11%
OP3EO	106%	50%	106%	93%	89%	73%	108%	103%	71%	72%	88%	76%	87%	92%	107%	101%	87%	106%	87%	88%	9%
4n-OP	96%	75%	106%	51%	105%	51%	88%	116%	58%	32%	105%	53%	113%	64%	105%	109%	83%	93%	98%	85%	7%
NP	106%	111%	101%	104%	104%	117%	100%	102%	106%	32%	63%	95%	117%	78%	107%	114%	106%	97%	115%	102%	8%
NP1EO	107%	81%	104%	107%	108%	95%	86%	109%	91%	64%	101%	112%	103%	105%	110%	71%	78%	98%	86%	108%	13%
NP2EO	102%	75%	106%	95%	93%	77%	84%	107%	84%	76%	86%	83%	71%	113%	104%	108%	76%	103%	71%	90%	14%
NP3EO	111%	87%	99%	104%	103%	82%	80%	112%	86%	68%	87%	103%	67%	101%	110%	90%	77%	100%	72%	106%	17%
Pyridabène	122%	81%	105%	96%	103%	97%	91%	82%	87%	69%	103%	106%	89%	109%	90%	73%	86%	94%	85%	55%	17%
4n-NP	95%	82%	54%	111%	103%	122%	89%	103%	80%	99%	63%	91%	95%	96%	89%	62%	89%	97%	96%	75%	10%

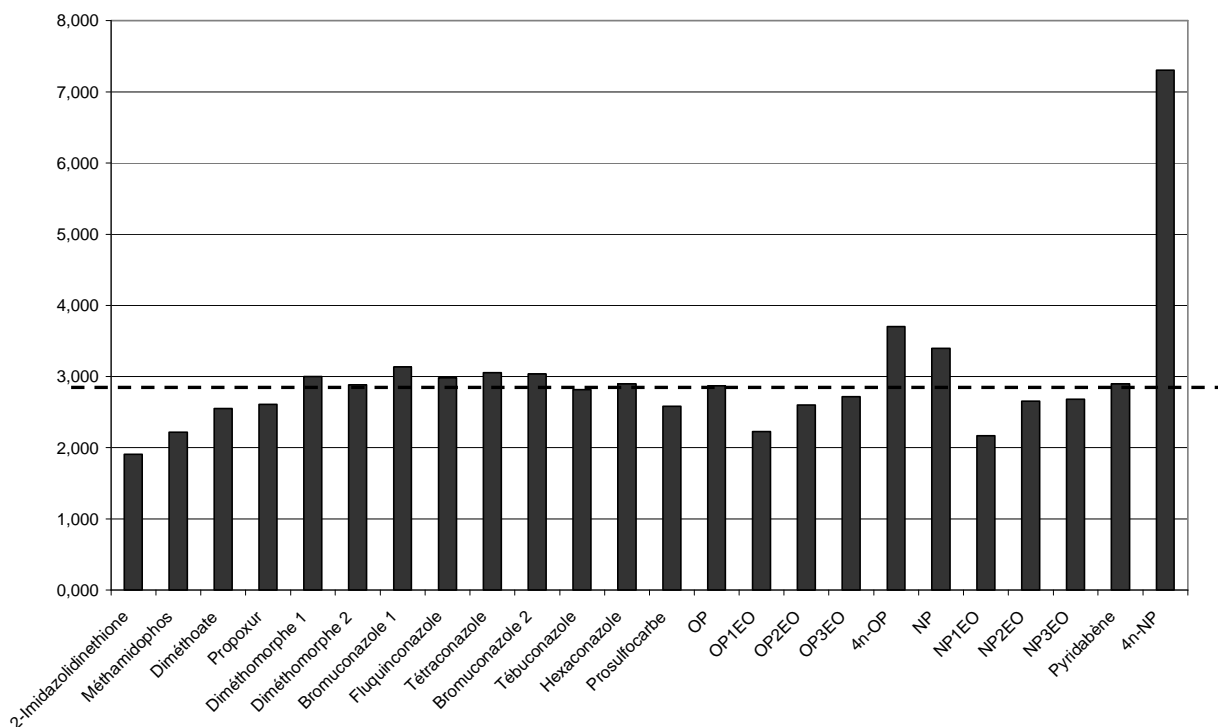
Résultats obtenus pour les 20 expériences du plan d'expérience factoriel



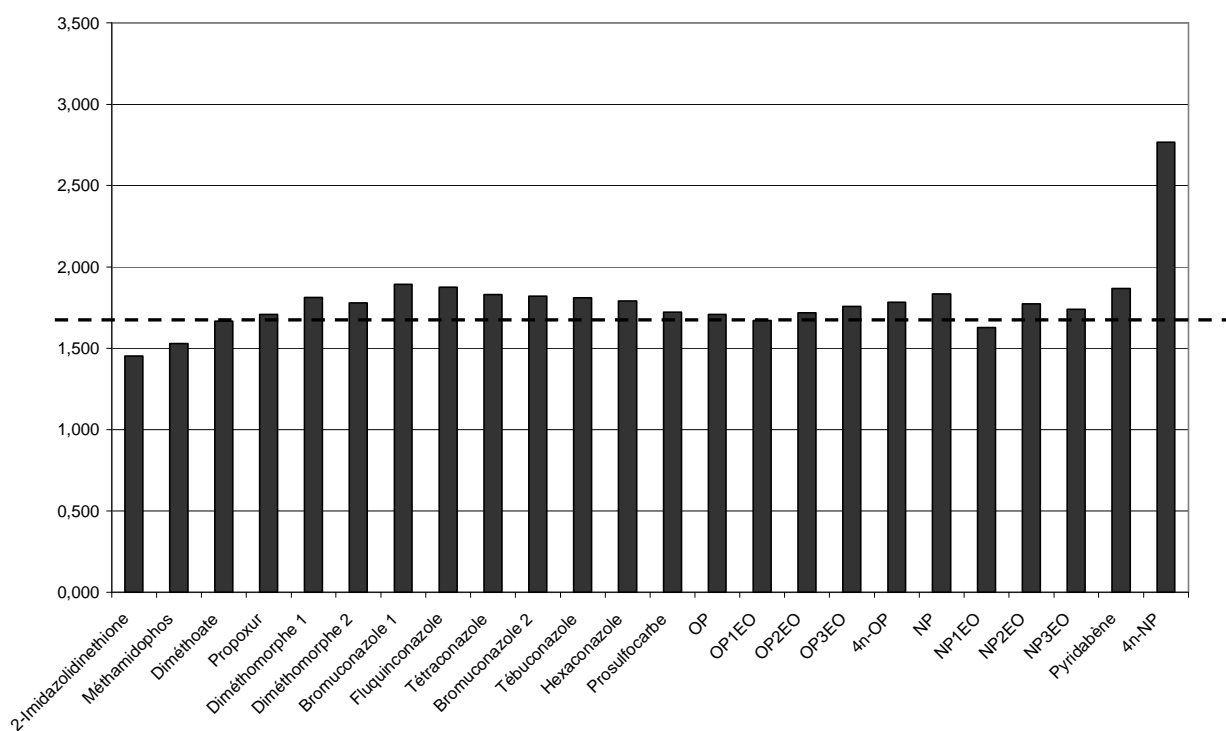
Coefficients d'interaction du premier ordre rapportés au modèle b_{34} , b_{24} et b_{23}

ANNEXE XV

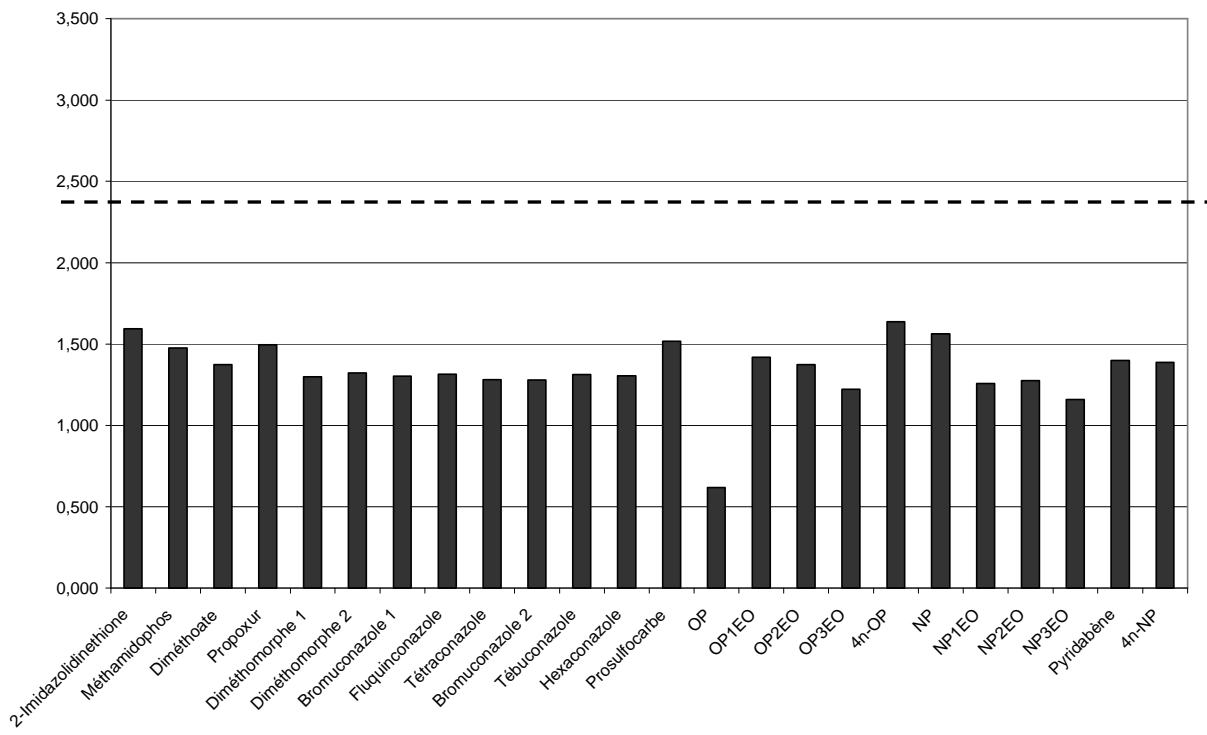
GRAPHES DE L'ETUDE DE L'EVAPORATION ET DE L'EFFET DE LA CONCENTRATION DES ANALYTES A PARTIR D'EXTRAITS BLANCS ET D'EXTRAITS DE BOUES DOPES



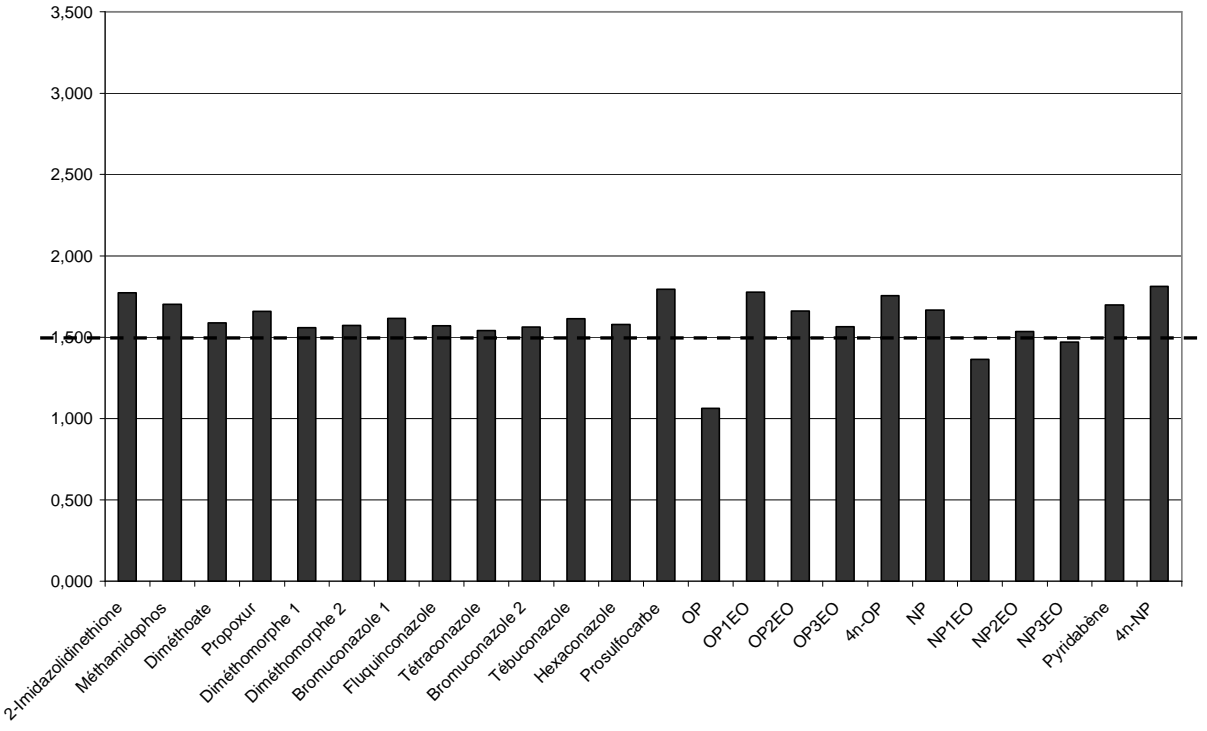
Rapports des aires obtenues lors de l'évaporation d'un extrait blanc dopé identiquement avant évaporation pour une masse finale de 1,5 g et 0,5 g, droite en pointillés représente le seuil théorique situé à 2,92



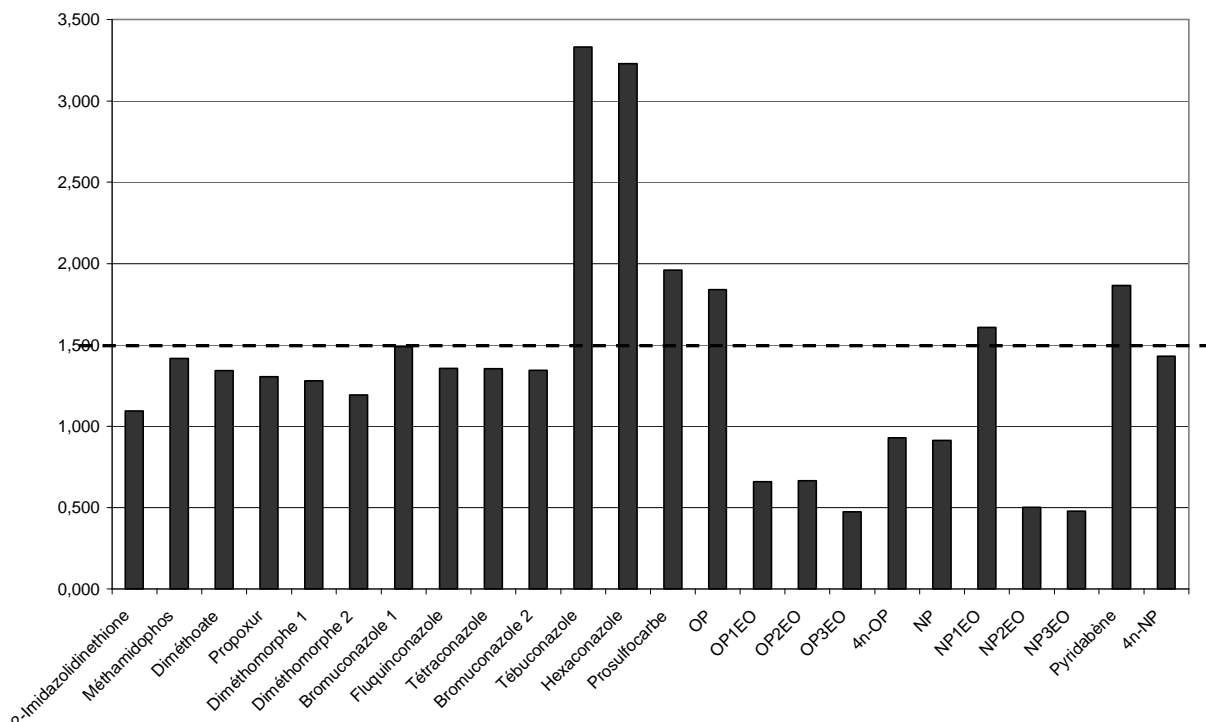
Rapports des aires obtenues lors de l'évaporation d'un extrait blanc dopé identiquement avant évaporation pour une masse finale de 1 g et 0,5 g, droite en pointillés représente le seuil théorique situé à 1,71



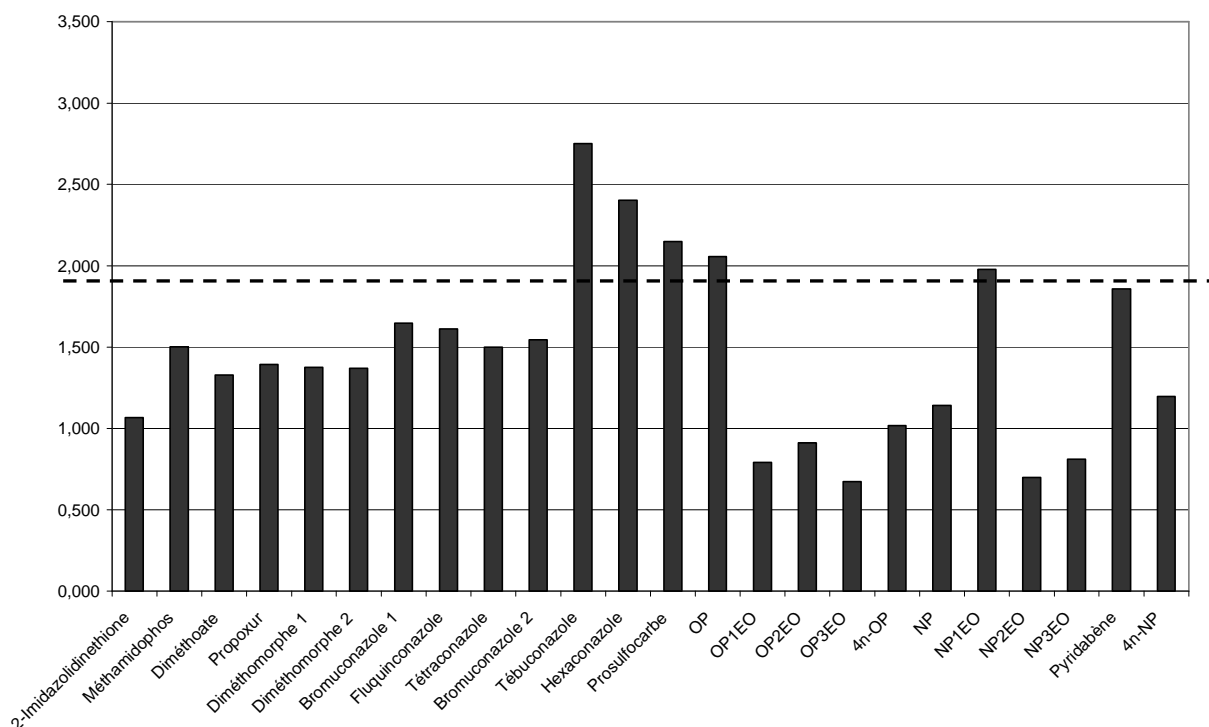
Rapports des aires obtenues lors de l'évaporation d'un extrait blanc dopé en fonction de la masse finale recherchée avant évaporation, résultats pour une masse finale de 1,5 g et 0,5 g, droite en pointillés représente le seuil théorique situé à 2,33



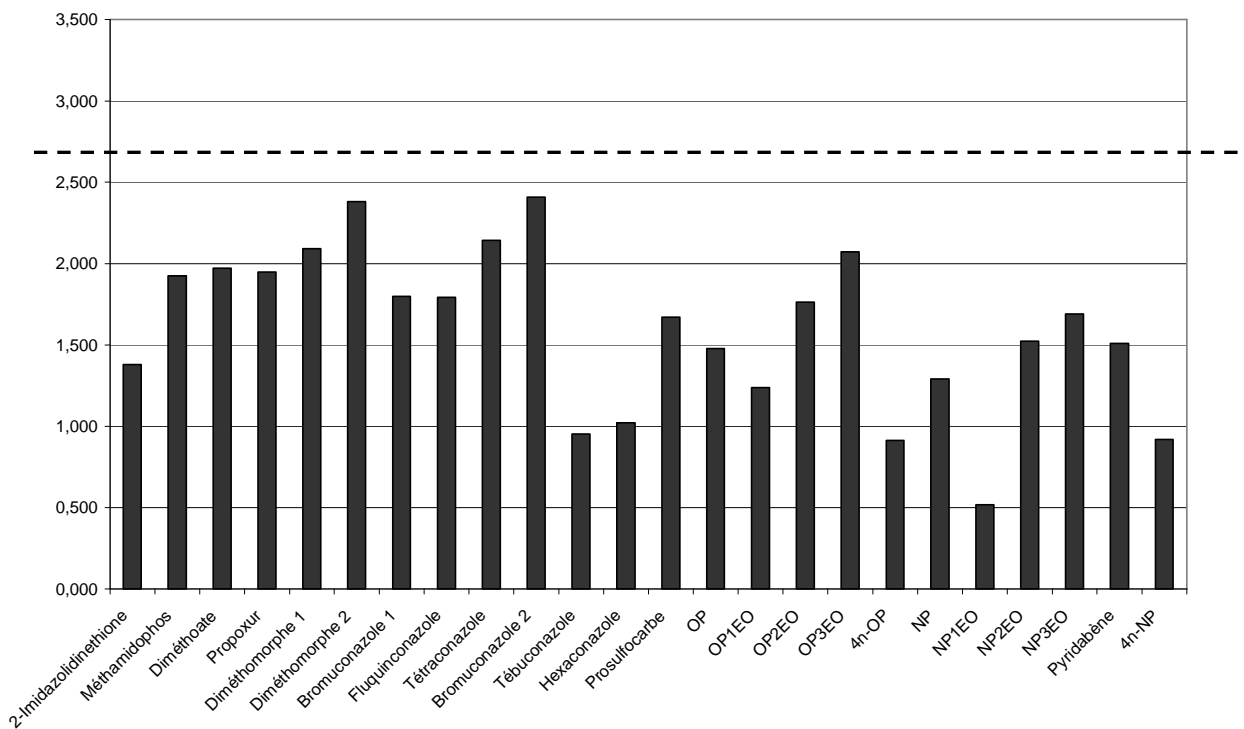
Rapports des aires obtenues lors de l'évaporation d'un extrait blanc dopé en fonction de la masse finale recherchée avant évaporation, résultats pour une masse finale de 1 g et 0,5 g, droite en pointillés représente le seuil théorique situé à 1,50



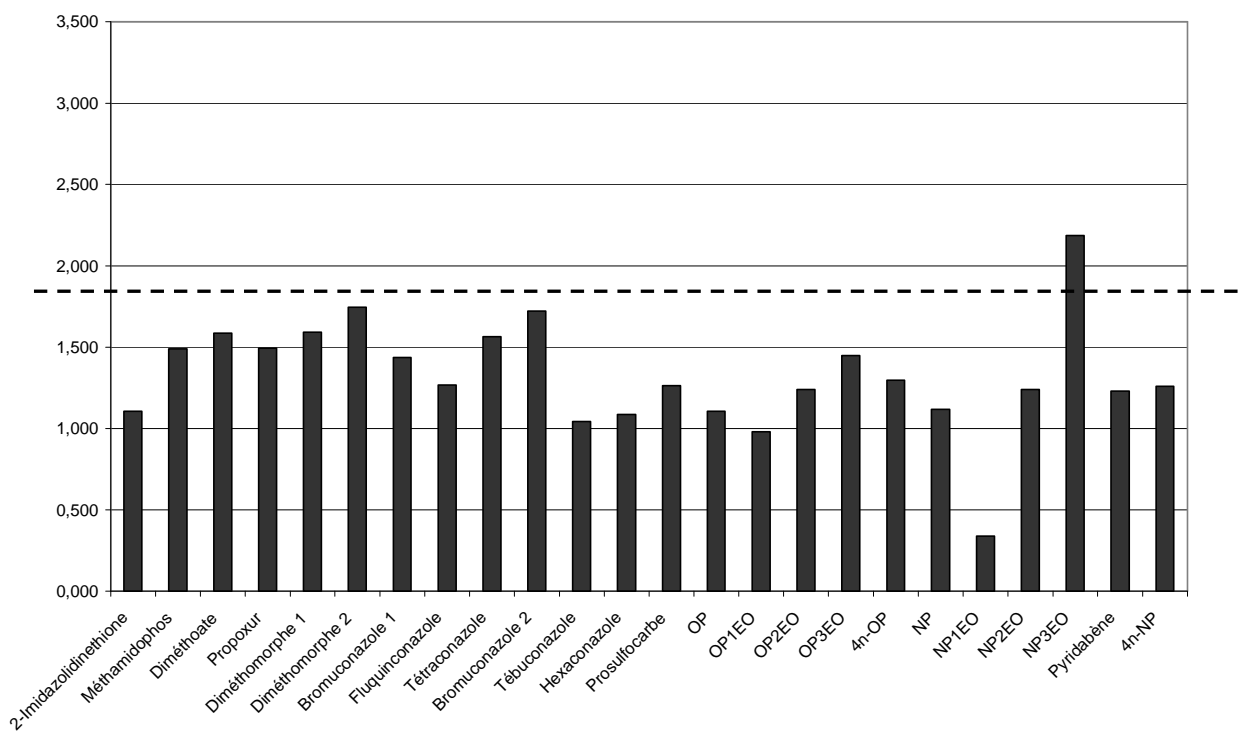
Rapports des aires obtenues lors de l'évaporation d'un extrait blanc dopé en fonction de la masse finale recherchée après évaporation, résultats pour une masse finale de 1,5 g et 0,5 g, droite en pointillés représente le seuil théorique situé à 1,50



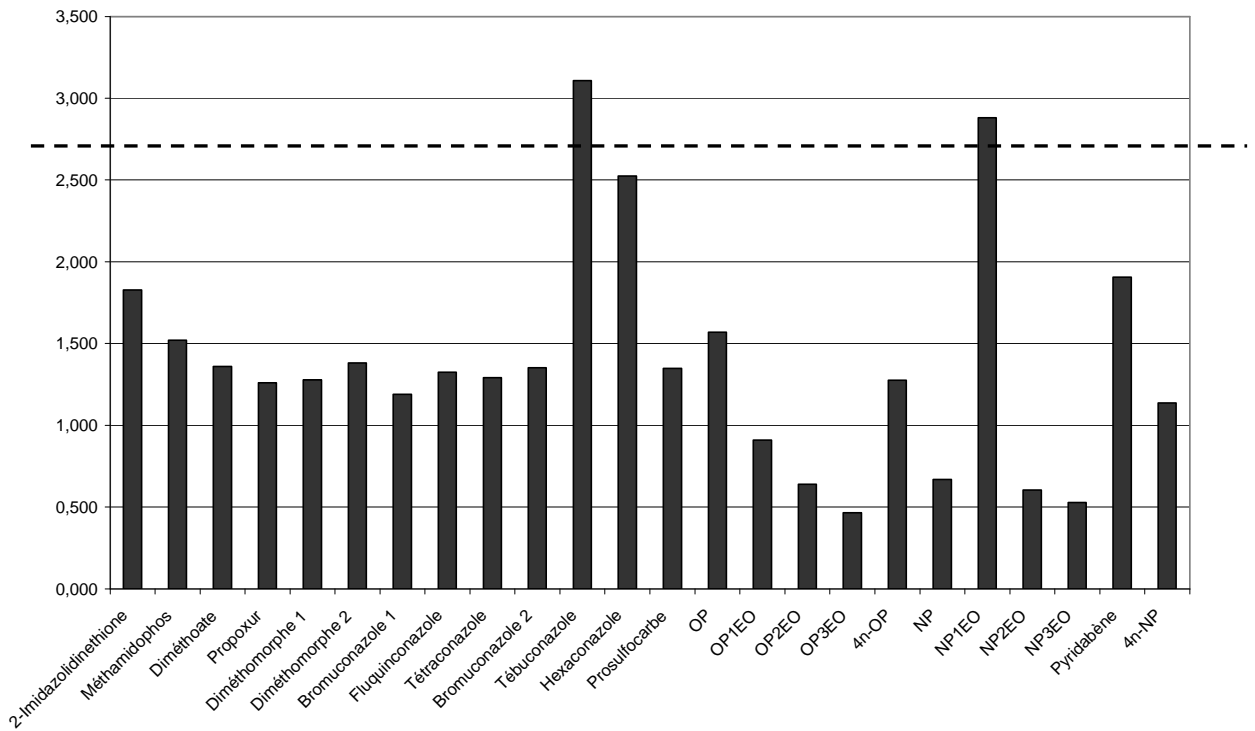
Rapports des aires obtenues lors de l'évaporation d'un extrait blanc dopé en fonction de la masse finale recherchée après évaporation, résultats pour une masse finale de 1 g et 0,5 g, droite en pointillés représente le seuil théorique situé à 1,95



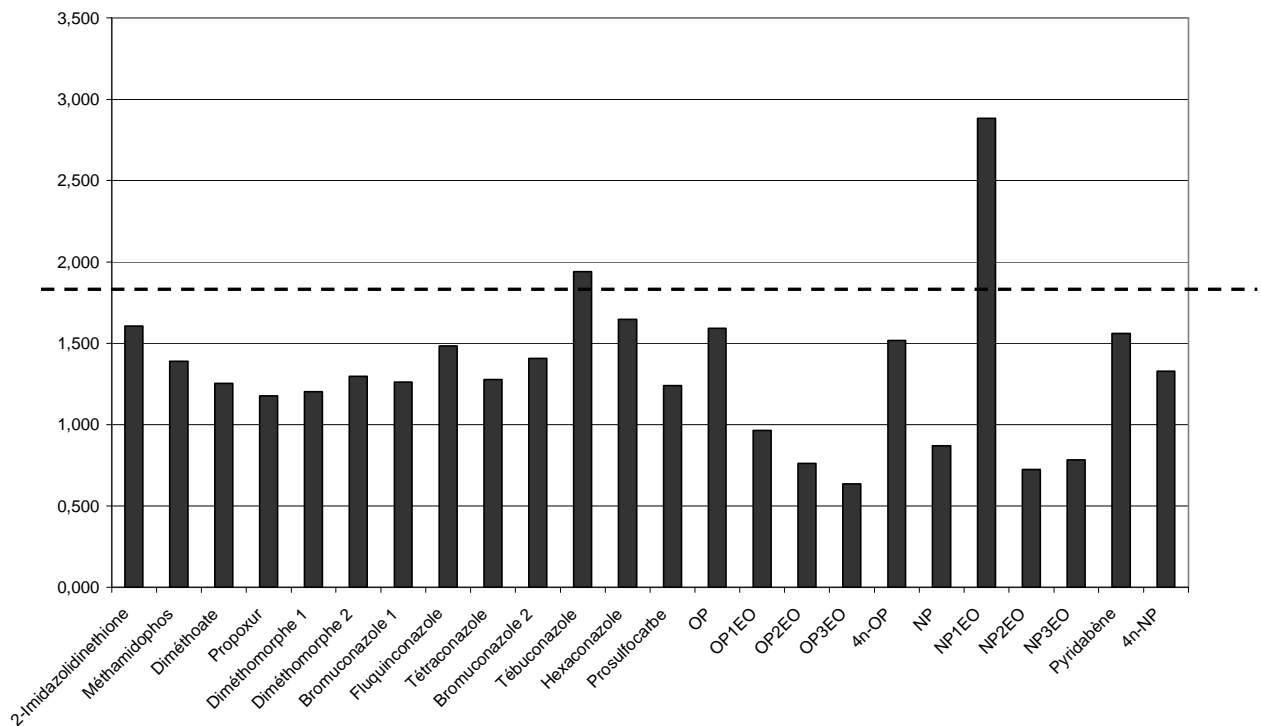
Rapports des aires obtenues lors de l'évaporation d'un extrait de boue dopé identiquement avant évaporation pour une masse finale de 1,5 g et 0,5 g, droite en pointillés représente le seuil théorique situé à 2,64



Rapports des aires obtenues lors de l'évaporation d'un extrait de boue dopé identiquement avant évaporation pour une masse finale de 1 g et 0,5 g, droite en pointillés représente le seuil théorique situé à 1,82



Rapports des aires obtenues lors de l'évaporation d'un extrait de boue dopé en fonction de la masse finale recherchée avant évaporation, résultats pour une masse finale de 1,5 g et 0,5 g, droite en pointillés représente le seuil théorique situé à 2,70



Rapports des aires obtenues lors de l'évaporation d'un extrait de boue dopé en fonction de la masse finale recherchée avant évaporation, résultats pour une masse finale de 1 g et 0,5 g, droite en pointillés représente le seuil théorique situé à 1,91

ANNEXE XVI

ETUDE STATISTIQUE DE LA REGRESSION LINEAIRE SUR LES EXTRAITS DE BOUES

Composé	Carbamate et résidu				Organophosphorés		
	2-imidazolidinethione	Propoxur	Prosulfocarbe	Méthamidophos	Diméthoate		
a	134,60	1141620,37	54731,56	42471,26	1033339,21		
Ecart type sur a	5,30	32298,96	1241,93	1101,94	30890,357		
b	-100,67	-28285,91	-712,10	-1014,64	-25365,68		
Ecart type sur b	28,43	3957,93	95,53	239,85	2996,33		
Coefficient de corrélation R ²	0,992	0,996	0,997	0,997	0,995		
Equation 1	5,579	4,040	2,352	1,681	1,095		
Equation 2	0,654	0,018	0,015	0,017	0,031		
LD (ppm)	0,634	0,010	0,005	0,017	0,009		
LQ (ppm)	2,112	0,035	0,017	0,056	0,029		

Composé	Fongicides										Acaricide
	Diméthomorphe	Bromuconazole	Fluquinconazole	Tétraconazole	Tébuconazole	Hexaconazole	Pyridabène				
a	330543,91	12515,97	111955,31	504154,47	38466,55	23297,29	731571,39				
Ecart type sur a	10403,83	434,41	4372,23	13845,85	1211,61	646,87	14424,98				
b	-9115,29	-401,34	-1724,83	-24672,46	-584,62	-349,54	-24442,47				
Ecart type sur b	1287,16	53,02	517,15	2641,45	75,03	47,13	1779,74				
Coefficient de corrélation R ²	0,995	0,994	0,992	0,996	0,995	0,996	0,998				
Equation 1	9,598	1,099	9,716	0,128	5,708	0,722	9,792				
Equation 2	0,033	0,029	0,022	0,054	0,014	0,007	0,038				
LD (ppm)	0,012	0,013	0,014	0,016	0,006	0,006	0,007				
LQ (ppm)	0,039	0,042	0,046	0,052	0,020	0,020	0,024				

Composé	Alkylphénols										
	tert-OP	4n-OP	OP ₁ EO	OP ₂ EO	NP ramifiés	4n-NP	NP ₁ EO	NP ₂ EO			
a	58,54	227706,44	97975,35	39557,91	21,14	56026,53	816148,35	10333,75			
Ecart type sur a	1,35	6184,05	1813,34	1248,04	0,59	908,80	22799,63099	379,78			
b	-131,45	-6840,19	-2513,65	-845,65	259,20	-1641,65	-13950,44	-605,77			
Ecart type sur b	25,88	765,09	214,48	147,62	11,86	112,44	1411,88	72,45			
Coefficient de corrélation R ²	0,997	0,996	0,998	0,995	0,996	0,999	0,996	0,993			
Equation 1	1,153	2,874	5,373		2,002	2,655	5,708	9,487			
Equation 2	3,322	0,032	0,035		0,563	0,029	0,014	0,046			
LD (ppm)	1,326	0,010	0,007	0,011	1,683	0,006	0,005	0,021			
LQ (ppm)	4,421	0,034	0,022	0,037	5,609	0,020	0,017	0,070			

ANNEXE XVII

RESULTATS OBTENUS SUR LES MATRICES SOLIDES

Composés	Sédiments Rhône	Dépôt toit 1	Dépôt toit 2	Dépôt toit 3	Dépôt toit 4	Retombées atmosphériques	Boue
NPs	52	48	nd	77	61	141	nd
OP	d	d	d	d	d	d	nd
OP ₁ EO	d	nd	nd	nd	nd	nd	1153
OP ₂ EO	2,2	nd	nd	nd	d	nd	353
OP ₃ EO	d	d	nd	d	d	d	d
NP ₁ EO	d	nd	nd	1,73	4,8	3,4	5854
NP ₂ EO	4,6	3,7	1,51	1,67	1,49	2,7	4005
NP ₃ EO	d	d	d	d	d	d	d
Diméthoate	nd	nd	nd	d	nd	d	nd
Méthamidophos	nd	nd	nd	nd	1,47	nd	nd
2-Imidazolidinethione	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Propoxur	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Prosulfocarbe	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Tébuconazole	1,00	1,60	1,23	1,55	1,53	3,9	nd
Hexaconazole	nd	nd	0,31	d	d	nd	nd
Tétraconazole	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Fluquiconazole	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Bromuconazole	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Diméthomorphe	d	d	nd	nd	nd	nd	nd
Pyridabène	d	nd	nd	nd	nd	nd	nd

d, détecté ; nd, non détecté

Résultats en ppb ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) obtenus sur des échantillons solides réels

Publications et Communications

Publications

- Baugros J.-B., Giroud B., Dessalces G., Grenier-Loustalot M.-F., Cren-Olivé C., Multiresidue analytical methods for the ultra-trace quantification of 33 priority substances present in the list of REACH in real water samples, *Analytica Chimica Acta*, 2008, **607**, 191-203

- Baugros J.-B., Cren-Olivé C., Giroud B., Gauvrit J. Y., Grenier-Loustalot M.-F., Lantéri P., Optimisation of pressurized liquid extraction by experimental design multiresidue ultra-trace quantification of substances concerned by european regulations in sludge, sediments and atmospheric fallout by tandem mass spectrometry-high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography*, 2009, sous presse

Communications orales

- " Analyse de traces et ultra-traces de substances de la liste prioritaire du système REACH dans des effluents et des boues de stations d'épuration par CG-SM et CL-SM/SM " - 1^{ère} journée du Club Jeunes AFSep – SEP07 – Grenoble, 19 mars 2007

- " Analyse de traces et d'ultra-traces des substances chimiques de la liste prioritaire du système REACH dans des eaux et des sols environnementaux par GC-MS et LC-MS/MS " - 25^{ième} journées de la Société Française de Spectrométrie de Masse – JFSM – Grenoble, 8 au 11 septembre 2008

- " Analytical method for the ultra-trace and trace determination of 11 priority substances of the REACH system and 22 regulated pesticides in various environmental parts " - 5th European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment – Marseille, 22 au 25 octobre 2008

Communications par poster

- " Analyse de traces et ultra-traces de substances de la liste prioritaire du système REACH dans des effluents et des boues de stations d'épuration par CG-SM et CL-SM/SM " - 7^{ième} congrès francophone de l'AFSep sur les sciences séparatives et les couplages – SEP07 – Grenoble, 20 au 22 mars 2007

- " Recherche et développement dans le domaine des substances chimiques : Préparation aux réponses du système REACH " - 15^{ième} Carrefours de la Fondation Rhône-Alpes Futur 2007 – Lyon, 29 novembre 2007

- " Ultra-trace detection and quantification of priority and regulated substances of the new European system, REACH, in environmental parts by GC-MS and LC-MS/MS " – 11th International Symposium on BioChromatography – Society for BioChromatography and Nanoseparation SBCN – Montpellier 13-16 mai 2008

- " Analyse de traces et ultra-traces de substances de la liste prioritaire du système REACH dans des effluents et des boues de stations d'épuration par CG-SM et CL-SM/SM " – Journée de printemps de la Société Française de Chimie – Grenoble, 5 juin 2008

RESUME

L'environnement et la santé des populations sont devenus des préoccupations majeures aussi bien au niveau national qu'au niveau européen. REACH (Registration, Evaluation and Authorization of CHemicals) est un système adopté par l'Union Européenne qui regroupe plus de quarante directives afin d'éliminer et de remplacer les substances chimiques les plus toxiques. Dans ce contexte, la mise en place d'un tel système requiert des méthodes d'analyse robuste, fiables et reproductibles dans le but d'évaluer et de détecter à l'état d'ultra-traces les molécules prioritaires persistantes dans les eaux et les sols.

Après avoir ciblé plusieurs substances listées sur l'annexe XVII de REACH, nous avons complété cette sélection par des polluants prioritaires de l'environnement Rhône Alpin tels les pesticides. Ainsi, la méthode d'analyse proposée permet de détecter et de quantifier par CPG-SM et CPL-SM/SM 33 substances (10 alkylphénols, 5 fongicides triazole, 1 fongicide morpholine, 1 acaricide pyridazinone, 2 phtalates, bisphénol A, 2 insecticides carbamates, un résidu des pesticides dithiocarbamates, 2 pesticides organophosphorés et 8 organochlorés) dans des matrices environnementales aussi complexes que des effluents et des boues de station épuration.

L'extraction des analytes est menée par Extraction sur Phase Solide (SPE) pour les échantillons aqueux et par Extraction par Solvant Accélérée (ASE) qui a été entièrement optimisée par étude statistique des paramètres. Les extraits sont ensuite purifiés de la même manière par SPE. La préparation à la validation de ma méthode nous a permis de confirmer des limites de détection basses comprises entre 7,2 ppt et 1,27 ppb dans les eaux et entre 5 ppb et 1,7 ppm dans les boues/sols.

TITRE en anglais

Research and development in the chemical substances: preparation to REACH system set up.

RESUME en anglais

The environment and the health of populations have raised major preoccupations at national level as well as European one. REACH (Registration, Evaluation and Authorization of CHemicals) is a system voted by European Union which brings together more than forty directives in order to eliminate and replace more toxic chemical substances. In this context, the set up of such a system requests robust, reliable and reproducible analytical method to evaluate and detect at ultra-traces level priority substances in waters and soils.

After targeting several substances listed on the annexe XVII of REACH, we have completed this selection by other priority pollutants for the environment of "Rhône-Alpes" region, like pesticides. Thus, the analytical method proposed allows the detection and the quantification by GC-MS and LC-MS/MS of 33 substances (10 alkylphenols, 5 triazole fungicides, 1 morpholino fungicides, 1 pyridazinone acaricide, 2 phthalates, bisphenol A, 2 carbamate insecticides, one dithiocarbamates pesticides residu, 2 organophosphorous pesticides and 8 organochlorines) in environmental matrices as complex as wastewater effluents and sludge.

The extraction of analytes was led by Solid Phase Extraction (SPE) for aqueous samples and by Accelerated Solvent Extraction (ASE) which was totally optimized by experimental design about parameters. Both extracts were purified by the same way by SPE. The preparation to the validation give us the confirmation of low detection limits comprised between 7.2 ppt and 1.27 ppb in waters and between 5 ppb to 1.7 ppm in sludge/soils.

DISCIPLINE Ecole Doctorale de Chimie spécialité : Chimie analytique

MOTS-CLES

REACH, substances prioritaires, effluents, boues, plan d'expériences, extraction
CPG-SM, CPL-SM/SM

LABORATOIRES :USR 059 Service Central d'Analyse – CNRS , Chemin du Canal – Echangeur de Solaize 69360 Solaize
UMR 5180 Laboratoire des Sciences Analytiques – CNRS, Bât. Curien – 43, Bd du 11 novembre 1918 69622 Villeurbanne Cedex