

# Évaluation de l'exposition prénatale au mercure : procédures opératoires standardisées



# Résumé

Le mercure est toxique pour les êtres humains et de nombreuses études ont porté sur les effets toxiques des différentes formes de cette substance. La biosurveillance humaine est considérée comme l'outil le plus efficace pour évaluer l'exposition cumulée des êtres humains au mercure. C'est durant la phase *in utero* que le mercure est le plus susceptible d'entraîner des effets néfastes sur le développement neurologique à long terme. Il est essentiel d'évaluer l'exposition prénatale au mercure pour mesurer les effets néfastes de cette substance en matière de santé publique ainsi que les bénéfices entraînés par les mesures visant à limiter l'exposition. Afin d'évaluer l'exposition à cette substance, il faut en mesurer les niveaux dans différentes matrices biologiques. Le niveau de mercure dans les tissus peut être un indicateur de l'exposition à plusieurs types de mercure. La validité, l'utilité et l'interprétation de ces mesures dépendent, entre autres facteurs, du type d'exposition au mercure et du type de mesure effectué. Ce document décrit les procédures opératoires standardisées pour évaluer le niveau de mercure dans les cheveux, le sang ombilical et l'urine. Suivre la procédure de contrôle qualité est essentiel pour obtenir des résultats fiables. Ce document fournit également des informations sur d'autres méthodes pouvant être utilisées pour analyser le mercure.

## Mots-clés

Biomarqueurs - analyse

Mercure - analyse

Effets retardés de l'exposition prénatale - analyse

Exposition maternelle - effets néfastes

Exposition environnementale

Veillez envoyer toute demande concernant les publications du Bureau régional de l'OMS pour l'Europe à :

Publications

Bureau régional de l'OMS pour l'Europe

UN City, Marmorvej 51

DK-2100 Copenhagen Ø, Denmark

Vous pouvez également remplir un formulaire de demande de documentation, d'informations sanitaires ou d'autorisation de reproduire/traduire, sur le site Web du Bureau régional, à l'adresse suivante :

<http://www.euro.who.int/fr/publications/request-forms>

Évaluation de l'exposition prénatale au mercure : procédures opératoires standardisées [Assessment of prenatal exposure to mercury: standard operating procedures (2018)]

© Organisation mondiale de la Santé 2020

ISBN 978 92 890 5485 0

Certains droits réservés. La présente publication est disponible sous la licence Creative Commons Attribution – Pas d'utilisation commerciale – Partage dans les mêmes conditions 3.0 IGO (CC BY NC-SA 3.0 IGO ; <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo/deed.fr>).

Aux termes de cette licence, vous pouvez copier, distribuer et adapter l'oeuvre à des fins non commerciales, pour autant que l'oeuvre soit citée de manière appropriée, comme il est indiqué ci-dessous. Dans l'utilisation qui sera faite de l'oeuvre, quelle qu'elle soit, il ne devra pas être suggéré que l'OMS approuve une organisation, des produits ou des services particuliers. L'utilisation de l'emblème de l'OMS est interdite. Si vous adaptez cette oeuvre, vous êtes tenu de diffuser toute nouvelle oeuvre sous la même licence Creative Commons ou sous une licence équivalente. Si vous traduisez cette oeuvre, il vous est demandé d'ajouter la clause de non responsabilité suivante à la citation suggérée : « La présente traduction n'a pas été établie par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS). L'OMS ne saurait être tenue pour responsable du contenu ou de l'exactitude de la présente traduction. L'édition originale anglaise est l'édition authentique qui fait foi ».

Toute médiation relative à un différend survenu dans le cadre de la licence sera menée conformément au Règlement de médiation de l'Organisation mondiale de la propriété intellectuelle.

**Citation suggérée.** Évaluation de l'exposition prénatale au mercure : procédures opératoires standardisées. [Assessment of prenatal exposure to mercury: standard operating procedures (2018)]; Copenhague : Organisation mondiale de la Santé ; 2020. Licence : CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

**Catalogage à la source.** Disponible à l'adresse <http://apps.who.int/iris>.

**Ventes, droits et licences.** Pour acheter les publications de l'OMS, voir <http://apps.who.int/bookorders>. Pour soumettre une demande en vue d'un usage commercial ou une demande concernant les droits et licences, voir <http://www.who.int/about/licensing>.

**Matériel attribué à des tiers.** Si vous souhaitez réutiliser du matériel figurant dans la présente oeuvre qui est attribué à un tiers, tel que des tableaux, figures ou images, il vous appartient de déterminer si une permission doit être obtenue pour un tel usage et d'obtenir cette permission du titulaire du droit d'auteur. L'utilisateur s'expose seul au risque de plaintes résultant d'une infraction au droit d'auteur dont est titulaire un tiers sur un élément de la présente oeuvre.

**Clause générale de non responsabilité.** Les appellations employées dans la présente publication et la présentation des données qui y figurent n'impliquent de la part de l'OMS aucune prise de position quant au statut juridique des pays, territoires, villes ou zones, ou de leurs autorités, ni quant au tracé de leurs frontières ou limites. Les traits discontinus formés d'une succession de points ou de tirets sur les cartes représentent des frontières approximatives dont le tracé peut ne pas avoir fait l'objet d'un accord définitif.

La mention de firmes et de produits commerciaux ne signifie pas que ces firmes et ces produits commerciaux sont agréés ou recommandés par l'OMS, de préférence à d'autres de nature analogue. Sauf erreur ou omission, une majuscule initiale indique qu'il s'agit d'un nom déposé.

L'Organisation mondiale de la Santé a pris toutes les précautions raisonnables pour vérifier les informations contenues dans la présente publication. Toutefois, le matériel publié est diffusé sans aucune garantie, expresse ou implicite. La responsabilité de l'interprétation et de l'utilisation dudit matériel incombe au lecteur. En aucun cas, l'OMS ne saurait être tenue responsable des préjudices subis du fait de son utilisation.

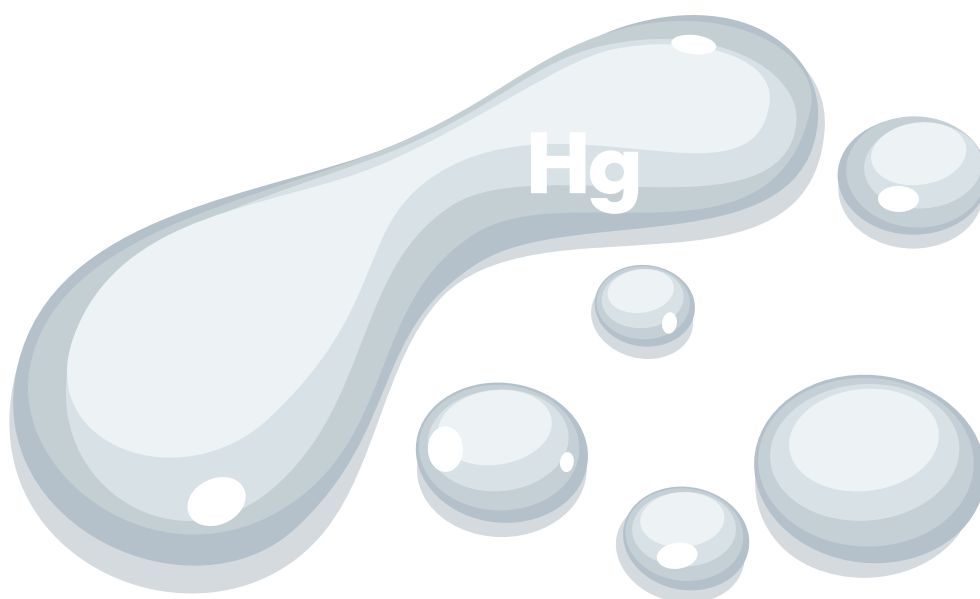
# Table des matières

Remerciements .....	iv
Introduction .....	1
Programme de contrôle de la qualité pour la biosurveillance du mercure chez l'homme .....	2
Procédure opératoire standardisée pour évaluer le niveau de mercure dans les cheveux humains .....	35
Procédure opératoire standardisée pour évaluer le niveau de mercure dans le sang ombilical ....	73
Procédure opératoire standardisée pour évaluer le niveau de mercure dans l'urine .....	100
Procédure opératoire standardisée pour le dosage du mercure présent dans les cheveux, le sang ombilical et l'urine à l'aide d'une autre méthode .....	138

# Remerciements

Les procédures opératoires standardisées pour évaluer l'exposition prénatale au mercure ont été développées dans le cadre du projet intitulé « Élaboration d'un plan pour la surveillance mondiale de l'exposition humaine au mercure et des concentrations de mercure dans l'environnement » financé par le Fonds pour l'environnement mondial.

Le Bureau régional de l'OMS pour l'Europe remercie sincèrement le Programme des Nations Unies pour l'environnement pour l'appui technique fourni durant toutes les étapes de ce projet depuis la phase de planification, durant la coordination des différents volets du projet lors de la mise en œuvre, jusqu'à l'organisation des discussions finales concernant les documents élaborés dans le cadre du projet.



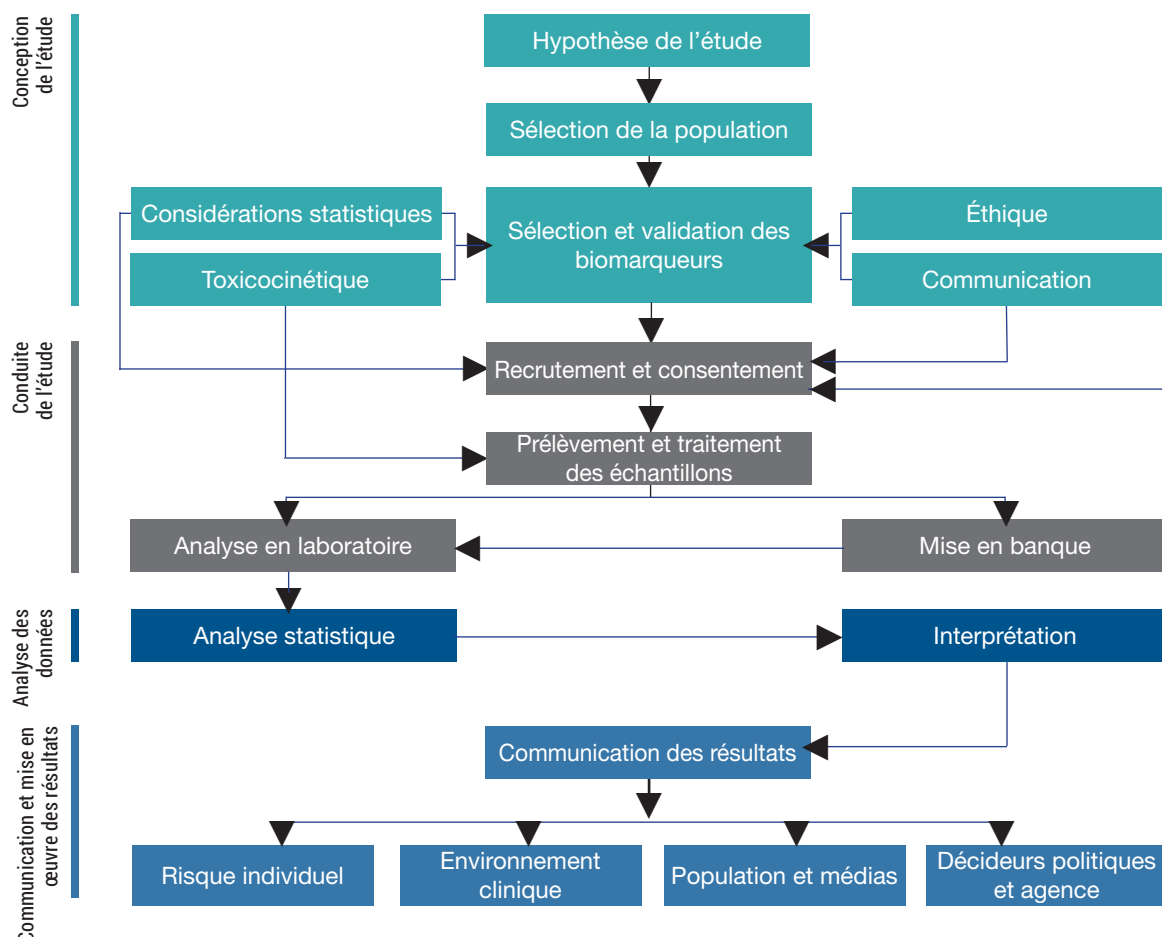
# Introduction

Bien que la biosurveillance humaine ait été communément utilisée pour mesurer l'exposition professionnelle à certaines substances, ce n'est que récemment que l'on a commencé à s'en servir pour évaluer l'exposition de l'ensemble de la population aux polluants de l'environnement. L'application de la biosurveillance humaine à ce domaine depuis quelques années a notamment été encouragée par différentes initiatives qui cherchent à améliorer notre compréhension du lien entre environnement et santé.

Le potentiel de la biosurveillance humaine dans le domaine de la santé publique est bien connu, même si le manque d'harmonisation entre les différents programmes et les différentes études de biosurveillance humaine peut considérablement entraver la comparaison et l'interprétation globale des résultats ainsi que l'élaboration de politiques fondées sur ceux-ci. Il est donc fondamental de développer un cadre harmonisé qui permettrait une utilisation véritablement efficace des données obtenues grâce aux études de biosurveillance humaine, telles que les projets ESBIO (Élaboration d'une approche cohérente de la biosurveillance humaine en Europe), COPHES (Consortium pour effectuer la biosurveillance humaine à l'échelle de l'Europe) et son étude de faisabilité parallèle, DEMOCOPHES, tous appuyés par l'Union européenne.

La mise en place d'une étude de biosurveillance humaine est un processus complexe impliquant des professionnels possédant diverses compétences techniques (épidémiologistes, chimistes analystes, toxicologistes, statisticiens, médecins et spécialistes de la communication), qui interviennent tous à différentes phases de l'étude. Ils œuvrent tous ensemble afin de gérer les interactions entre les différentes disciplines concernées (cf. Figure 1).

Figure 1. Étapes d'une étude de biosurveillance humaine



Source : National Research Council of the National Academies (1).

# Programme de contrôle de la qualité pour la biosurveillance du mercure chez l'homme

## Résumé

L'objectif de ce document est de définir une procédure efficace pour mener des activités de contrôle de la qualité afin de garantir la fiabilité des résultats obtenus dans le cadre des études de biosurveillance humaine du mercure. Ces activités concernent exclusivement les phases de préanalyse et d'analyse de ces études. Les mesures décrites doivent être considérées comme des recommandations à suivre lors de la planification et du déroulement des études de biosurveillance humaine à l'échelle nationale, régionale ou internationale. Ce document doit être utilisé conjointement avec les procédures opératoires standardisées pertinentes concernant le prélèvement d'échantillons et l'analyse du mercure dans les cheveux, le sang ombilical et l'urine des êtres humains.

## Mots-clés

Mercure - analyse  
Composés du méthylmercure - analyse  
Biomarqueurs - analyse  
Exposition maternelle  
Échange mère-enfant  
Nourrisson, nouveau-né  
Exposition environnementale  
Contrôle de la qualité  
Santé publique

## Contributeurs

Argelia Castaño Calvo  
National Centre for Environmental Health, Carlos III Institute of Health (Espagne)  
Marta Esteban López  
National Centre for Environmental Health, Carlos III Institute of Health (Espagne)  
Miguel Angel Lucena  
National Centre for Environmental Health, Carlos III Institute of Health (Espagne)

# Table des matières

<b>Abréviations .....</b>	<b>4</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>5</b>
<b>1. Contrôle de la qualité lors de la phase de préanalyse .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Contrôle de la qualité lors de la phase d'analyse .....</b>	<b>9</b>
2.1. Contrôle interne de la qualité .....	9
2.1.1. Étalons .....	9
2.1.2. Matériel.....	9
2.1.3. Conservation des échantillons .....	10
2.1.4. Préparation des courbes d'étalonnage .....	10
2.1.5. Analyse des blancs de test .....	13
2.1.6. Réitération .....	13
2.1.7. Contrôles de la qualité .....	14
2.2. Contrôles externes de la qualité .....	15
2.2.1. Attribuer une valeur à l'échantillon.....	16
2.2.2. Déterminer l'écart-type $\hat{\sigma}$ pour les essais d'aptitude.....	16
2.2.3. Critères pour déterminer le nombre de mesures que devra effectuer chaque laboratoire participant .....	19
2.2.4. Déroulement du test d'homogénéité.....	19
2.2.5. Déroulement du test de stabilité.....	21
2.2.6. Instructions pour les participants .....	21
2.2.7. Calcul des paramètres statistiques pour les résultats de l'essai d'aptitude .....	22
2.2.8. Score z .....	22
2.2.9. Nombre $E_n$ .....	23
2.2.10. Score z'.....	23
2.2.11. Score zéta ( $\zeta$ ) .....	24
2.2.12. Score $E_z$ .....	24
<b>3. Évaluation des résultats du laboratoire .....</b>	<b>25</b>
<b>4. Références et bibliographie .....</b>	<b>26</b>
<b>Annexe 1. Enregistrement de la réception d'un échantillon.....</b>	<b>27</b>
<b>Annexe 2. Enregistrement des échantillons collectés.....</b>	<b>28</b>
<b>Annexe 3. Auto-évaluation des compétences du laboratoire .....</b>	<b>29</b>

# Abréviations

BSH biosurveillance humaine

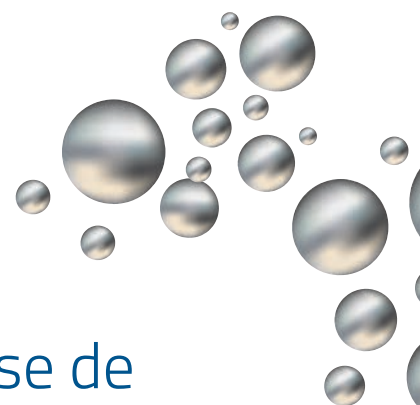
ID identification



# Introduction

Généralement, le contrôle de la qualité se fait durant la phase d'analyse. Tous les laboratoires utilisent des outils tels que des blancs, des courbes d'étalonnage et des échantillons de contrôle durant l'analyse afin de faire en sorte que leurs résultats soient fiables. Toutefois, les mesures de contrôle sont souvent absentes durant les autres phases des études de biosurveillance humaine, alors que ces phases sont tout aussi, voire plus importantes en matière de contrôle de la qualité.

Il est important de signaler que toutes les précautions et mesures de contrôle mises en place durant l'analyse chimique sont inutiles si les échantillons ont été contaminés ou altérés durant le prélèvement, le transport ou la préparation. Compte tenu de cela, la biosurveillance humaine ne doit pas commencer dans le laboratoire ; les mesures de contrôle de la qualité doivent couvrir toutes les étapes de la phase de préanalyse, en particulier la phase de prélèvement de l'échantillon (matériel, flacons, procédures et documentation), le transport (la température et les exigences du transport), le prétraitement des échantillons (centrifugation et extraction), l'aliquotage et la conservation. Ensuite, les mesures de contrôle doivent être mises en place lors des analyses chimiques puis durant l'analyse des données, en appliquant les mesures de contrôle de la qualité aux bases de données générées



## 1. Contrôle de la qualité lors de la phase de préanalyse

Dans toutes les études impliquant des spécimens biologiques, l'intégrité des échantillons repose en grande partie sur la phase de préanalyse. Généralement, il y a deux types de facteurs qui peuvent altérer un échantillon avant qu'il ne soit analysé.

- Des facteurs d'influence, qui dépendent de chaque biomarqueur, apparaissent avant que l'échantillon ne soit collecté. Parmi les exemples de facteurs d'influence qui peuvent modifier la concentration des biomarqueurs, on retrouve la demi-vie biologique d'un élément chimique, la consommation d'alcool, la prise de médicaments ou les habitudes individuelles, comme le régime alimentaire. Par conséquent, ces questions doivent être prises en compte durant la conception d'une étude dans la description de la population étudiée, des considérations statistiques, des stratégies de prélèvement, du recrutement ou de la sélection des biomarqueurs/matrices ainsi que durant la phase d'interprétation des résultats.
- Dans le cas des facteurs d'interférence, la concentration du biomarqueur est modifiée après le prélèvement, en raison, par exemple, d'une contamination externe, de changements physiques ou chimiques au sein du biomarqueur durant le transport ou la conservation, ou de changements dans la matrice biologique tels que la coagulation ou la sédimentation. Il est possible de prendre des précautions pour éviter ces altérations et une contamination éventuelle durant le prélèvement et le transport, le traitement et la conservation des échantillons. En outre, dans ce domaine, il est tout à fait important d'avoir à disposition du personnel de terrain correctement formé.

Dans les études de biosurveillance humaine impliquant la population générale présumée non exposée à la substance, les mesures de contrôle durant la phase de préanalyse sont encore plus importantes que dans d'autres types d'études menées sur des échantillons biologiques, en raison des caractéristiques spécifiques aux études de biosurveillance humaine, en particulier le type de substance analysée et les niveaux de concentration, deux éléments que ces études servent habituellement à mesurer. Par conséquent, lorsque l'on mesure un produit chimique se trouvant dans l'environnement, il existe un risque de contamination de l'échantillon en raison de la présence même de cette substance dans l'environnement. Ceci est particulièrement important dans le cas des éléments chimiques très répandus qui peuvent même être présents dans le matériel de prélèvement (2). En outre, comme l'exposition à des éléments chimiques présents dans l'environnement se fait à des concentrations faibles, on les trouve dans les matrices biologiques à des niveaux généralement faibles ; par conséquent, une contamination éventuelle aurait une très forte influence sur les résultats.

Il est donc essentiel d'identifier et d'éviter les sources possibles de contamination, par exemple :

- les contaminations exogènes sur le lieu de prélèvement ;
- les contaminations à partir du matériel de prélèvement ou des flacons ; et
- les contaminations provoquées par l'absorption des composants devant être analysés au sein des parois des flacons utilisés.

Les facteurs d'influence pour le biomarqueur cible doivent être identifiés et une stratégie de prélèvement en tenant compte doit être élaborée. Enfin, il faut sauvegarder les informations requises pour garantir une interprétation correcte des résultats.

Même si plusieurs outils peuvent être utilisés pour mener à bien les activités de contrôle de la qualité, les procédures opératoires standardisées (POS) représentent généralement l'outil le plus utile. C'est un document écrit contenant une description claire, concise, complète et détaillée, étape par étape, de la procédure de prélèvement ou de recrutement ou de la méthode d'analyse.

Ces procédures peuvent être suivies à n'importe quelle étape d'une étude pour obtenir des informations basiques en matière de contrôle de la qualité. Cela permet à différents laboratoires ou équipes de recherche d'obtenir des résultats comparables. Compte tenu de ce qui précède, les procédures opératoires standardisées concernant la sélection des participants et le protocole de recrutement doivent être élaborés en même temps que celles relatives au prélèvement, au transport, au traitement et à la conservation des échantillons, afin de maîtriser autant que possible tous les facteurs qui pourraient influencer sur l'échantillon durant la phase de préanalyse.

Parmi les autres mesures de contrôle, l'on retrouve l'utilisation de blancs de terrain et le prélèvement de réplicats. Il existe différents types de blancs pouvant être utilisés sur le terrain pour évaluer le risque éventuel de contamination d'un échantillon lors du prélèvement ou durant le transport jusqu'à son arrivée au laboratoire. Un flacon ou un tube vide (venant du même lot que le reste du matériel) peut servir de blanc de prélèvement. Ces blancs sont particulièrement utiles lorsque le matériel n'a pas pu être préalablement examiné mais aussi pour mesurer la contamination environnementale. Des blancs peuvent aussi être préparés durant l'aliquotage. Les blancs doivent être traités et manipulés comme s'il s'agissait de véritables échantillons afin de pouvoir évaluer une éventuelle contamination durant la procédure.

Il est aussi essentiel de veiller à ce que l'échantillon collecté soit représentatif et reflète la composition de l'original. Par conséquent, durant l'aliquotage, tous les échantillons doivent être homogénéisés avant d'être divisés. D'autres outils utiles pour effectuer les activités de contrôle de la qualité sont les listes de contrôle décrivant le matériel nécessaire ou les points importants à vérifier.

Il faut faire particulièrement attention au matériel de prélèvement et de conservation car différents types d'interférence ont été décrits entre les matériaux composant les flacons ou les tubes dans lesquels les échantillons ont été collectés et la substance cible. Par exemple, il faut éviter d'utiliser du verre dans le cadre d'une analyse portant sur des métaux (3). De même, certains types de plastique

peuvent faire augmenter les valeurs de concentration des biomarqueurs, notamment le bisphénol A ou les phtalates (2).

Il est crucial de contrôler le matériel de prélèvement et de conservation lors des études de biosurveillance humaine, car comme indiqué précédemment, les concentrations mesurées sont décrites en parties par million ou en parties par milliard (ou encore plus faibles), ce qui signifie que la moindre contamination de fond peut avoir d'importantes répercussions sur les résultats finaux. Afin de maîtriser cette source potentielle d'erreurs, les approches suivantes peuvent être mises en place pour contrôler le matériel de prélèvement.

- Il faut réaliser un examen préalable du matériel de prélèvement, ce qui consiste à examiner un lot de tubes ou de flacons collecteurs avant le prélèvement, pour veiller à ce que les risques de contamination de fond soient négligeables (< limite de détection) et que celle-ci n'ait aucune répercussion sur les mesures finales. Cette précaution s'applique également au matériel de conservation.
- Dans certains cas, le matériel de prélèvement et de conservation peut être prénettoyé afin d'éliminer tout risque de contamination de fond. Par exemple, les flacons utilisés pour collecter de l'urine à des fins d'analyse de résidus de métal peuvent être nettoyés à l'aide d'une solution diluée d'acide nitrique afin d'éliminer toute trace de métal dans ces flacons. Il convient d'analyser 5 % du matériel prénettoyé pour vérifier que ce traitement a été efficace.
- Le matériel disposant d'une certification indiquant une concentration du biomarqueur cible inférieure au taux minimum peut être utilisé. Certains matériaux sont vendus avec des certificats indiquant l'absence ou un taux minime d'un élément chimique spécifique. Par exemple, des tubes spéciaux sont disponibles pour l'analyse de métaux-traces dans les échantillons sanguins.

Le moment du prélèvement est crucial durant la phase de préanalyse (4). Pour effectuer correctement un prélèvement d'échantillons, il faut disposer de procédures opératoires standardisées contenant des instructions détaillées étape par étape. De même, consigner par écrit tout événement qui se produit durant le prélèvement ainsi que tous les paramètres liés à ce prélèvement (date et heure du prélèvement, volume, longueur et couleur) constitue une mesure efficace de contrôle de la qualité. La mise en place de ces dispositions permet notamment d'identifier la contamination croisée d'un échantillon (par exemple, un échantillon d'urine contaminé par du sang à cause de la macération provoquée par le transport). En outre, bien décrire le travail sur le terrain facilite la communication et contribue à éviter les malentendus et les erreurs au sein de l'équipe présente sur le terrain et entre les membres de cette équipe et le personnel de laboratoire.

Enfin, la traçabilité des échantillons doit être garantie, ce qui implique une identification claire des spécimens et des documents connexes (questionnaires et données personnelles).

Par conséquent, la qualité des étiquettes utilisées doit être contrôlée afin de garantir que les codes d'identification (ID) puissent rester lisibles quels que soient la température et le degré d'humidité et pour faire en sorte bien sûr, que l'étiquette reste bien collée au tube, flacon ou document.

Après le prélèvement, les échantillons collectés doivent être transportés dans les conditions requises pour garantir leur intégrité. Il s'agit d'un autre point critique. Le transport vers le laboratoire doit se faire dans le respect des règles de transport des matières biologiques.

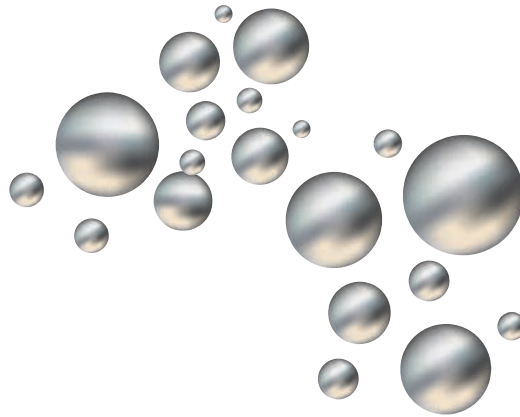
La dernière étape de la phase de préanalyse est la conservation des échantillons et la mise en banque du matériel biologique (si cela est prévu) ; toutefois, une étape précédente, à savoir la réception des échantillons et l'évaluation au moyen de critères d'acceptation/de refus des échantillons, ne doit pas être négligée. Bien que ces étapes soient parfois oubliées, elles constituent des points de contrôle essentiels.

Lorsque les échantillons arrivent au laboratoire, l'intégrité de l'emballage et l'état des tubes et des flacons contenant les échantillons doivent être vérifiés. Tout problème détecté, comme un emballage ouvert ou endommagé ou un échantillon renversé, doit être signalé. Pour veiller à ce que ces tâches soient effectuées correctement, il est conseillé d'établir un protocole de réception des échantillons

qui détaille les éléments à vérifier et permet de consigner par écrit les problèmes détectés sur un formulaire d'enregistrement des échantillons (cf. Annexes 1 et 2).

Les exigences liées au transport des échantillons doivent être définies au préalable afin d'établir les points critiques devant être vérifiés. Les vérifications doivent commencer par l'extérieur, c'est-à-dire qu'il faut d'abord vérifier l'état de l'emballage avant de l'ouvrir pour continuer la procédure. Si les spécimens biologiques sont accompagnés de questionnaires ou d'autres documents, ces derniers doivent également être vérifiés lors de la réception de l'échantillon, à l'aide des critères d'acceptation/de refus définis au préalable.

Bien que les procédures opératoires standardisées représentent un outil essentiel, elles ne portent pas sur tous les aspects et il est indispensable d'avoir un personnel de laboratoire et de terrain bien formé.



## 2. Contrôle de la qualité lors de la phase d'analyse

Du point de vue analytique, il est essentiel d'établir un programme d'assurance de la qualité et de contrôle de la qualité afin d'obtenir des résultats qui soient fiables et comparables. Ces programmes doivent couvrir à la fois les mesures basiques d'assurance et de contrôle de la qualité systématiquement utilisées dans les laboratoires d'analyse ainsi qu'une action externe visant à garantir la fiabilité et la comparabilité des résultats.

Les contrôles internes de la qualité sont des outils basiques dans les laboratoires d'analyse car il est essentiel d'harmoniser les activités de contrôle ainsi que les procédures opératoires standardisées utilisées pour obtenir les résultats. Par conséquent, les activités de contrôle de la qualité doivent constituer l'un des points fondamentaux décrits dans la procédure de travail, et les critères de tolérance doivent être bien définis avant que tout essai ne soit effectué.

Pour perfectionner la méthode, il faut obligatoirement prendre en compte les paramètres tels que le contrôle des blancs, les contrôles de répétabilité, de reproductibilité ou la véracité qui permettent d'en évaluer l'efficacité. Aucun résultat externe ne doit être communiqué en l'absence de résultats corrects des contrôles internes de qualité portant sur l'analyse et en l'absence de confirmation de la part du laboratoire que ces critères ont été respectés.

La présente procédure porte sur la réalisation des contrôles de la qualité associés aux méthodes instrumentales, qui sont généralement des méthodes basées sur la préparation de courbes de travail au sein desquelles les résultats des échantillons peuvent être interpolés.

Les comparaisons entre laboratoires peuvent servir à évaluer les capacités d'un laboratoire spécifique. Afin d'obtenir suffisamment d'informations sur les performances d'un laboratoire, au moins trois cycles doivent être envisagés : la phase de préanalyse des échantillons, la phase d'analyse et la phase post-analyse. De cette manière, il est possible d'évaluer l'exactitude des résultats des participants et de garantir la validité de l'étude.

La participation à chacune de ces étapes doit être évaluée en fonction des critères définis. En cas de résultats insatisfaisants lors de l'une ou de plusieurs de ces étapes, il convient d'enquêter sur les causes et celles-ci doivent être éliminées et corrigées. Dans ce contexte, il est possible d'organiser des exercices interlaboratoires pour démontrer comment certains laboratoires obtiennent de meilleurs résultats que d'autres.

### 2.1. Contrôles internes de la qualité

#### 2.1.1. Étalons

Les contrôles de qualité en interne doivent être effectués à l'aide d'étalons certifiés, lorsque c'est possible. Ces étalons doivent être certifiés afin de pouvoir les relier aux étalons internationaux. En outre, ils doivent avoir un degré d'incertitude associé afin d'évaluer les intervalles de confiance et de permettre au laboratoire de déterminer l'exactitude de ses résultats.

Toute manipulation de ces étalons (par exemple par dilution afin d'obtenir une concentration moindre de la valeur nominale) signifie que le laboratoire doit calculer la nouvelle incertitude en fonction du degré d'incertitude initial de l'étalon et de ceux associés à l'équipement volumétrique utilisé durant la préparation. Si la méthode d'analyse a été correctement validée, ces incertitudes doivent avoir été prises en compte et doivent donc être incluses dans les tolérances définies dans la validation.

#### 2.1.2. Matériel

Le matériel qui peut avoir des répercussions sur le résultat de l'essai doit être étalonné. À cet égard, les laboratoires doivent avoir des tolérances prédéfinies qui peuvent être utilisées pour accepter ou refuser les résultats de ces étalonnages.

Le matériel volumétrique doit atteindre la tolérance établie pour sa classe, même si, en règle générale, il ne faut utiliser que du matériel volumétrique de classe A.

Les balances de précision doivent être utilisées pour peser des étalons ou des échantillons, lorsque c'est nécessaire. Par exemple, dans le cas d'une analyse de cheveux, il faut peser au minimum 30 mg de l'échantillon ou de l'étalon si la balance a une résolution de 0,1 mg (balance à quatre décimales). Si le laboratoire dispose d'une balance de précision à cinq décimales, celle-ci doit être utilisée pour des éléments pesant au minimum 3 mg. Peser des éléments plus légers entraîne des erreurs qui pourraient avoir des répercussions sur le degré d'incertitude du résultat final ou augmenter le risque d'erreur lors de l'analyse.

### 2.1.3. Conservation des échantillons

La bonne conservation des échantillons est essentielle pour obtenir des résultats valides. Le laboratoire doit avoir des protocoles écrits destinés à prévenir la dégradation ou la contamination des échantillons. Les conditions de conservation (température, luminosité, étanchéité à l'air ou à l'eau, humidité et durée de conservation) doivent y être définies.

Les échantillons d'urine ou de sang doivent être conservés dans un réfrigérateur ( $< 5^{\circ}\text{C}$ ) sans lumière, dans un flacon étanche à l'air et à l'eau, avant d'être analysés. Les échantillons de cheveux peuvent être conservés à température ambiante mais doivent être à l'abri de l'humidité.

Les laboratoires doivent éliminer tout risque de contamination des échantillons. La manipulation des échantillons doit se faire dans un environnement propre. Pour se faire une idée du niveau de propreté lors de la procédure, on peut procéder au dosage des blancs, qui doivent être traités de la même manière que les échantillons.

### 2.1.4. Préparation des courbes d'étalonnage

Le laboratoire doit préparer une courbe d'étalonnage au moins tous les trois mois et s'en servir jusqu'à ce que la prochaine soit établie. Il faut préparer des courbes avec un minimum de cinq points. L'intervalle de la courbe doit inclure les valeurs attendues de tous les échantillons, ou au moins de la grande majorité d'entre eux.

Si le laboratoire a recours à un processus de validation de la méthode assorti de paramètres associés à la courbe obtenue et à des tolérances pour ces paramètres, la courbe d'étalonnage de travail doit être conforme aux critères d'acceptabilité obtenus.

Si aucune méthode n'a été validée, le laboratoire doit établir au préalable des critères d'acceptabilité pour le coefficient de régression, le coefficient linéaire et la pente d'au moins deux paramètres.

### Coefficient de corrélation

Le coefficient de corrélation ( $r$ ) est une façon de déterminer la part de la variabilité totale d'une variable dépendante ( $y$ ) par rapport à sa moyenne, qui est expliquée par le modèle de régression. Ce paramètre est un bon indicateur de la qualité de l'ajustement de la courbe de régression.

Le coefficient de corrélation est considéré comme adéquat s'il est plus élevé que ceux indiqués dans le tableau 1 pour l'intervalle de confiance autorisé et les degrés de liberté correspondants. Généralement, un intervalle de confiance de 95 % est considéré comme approprié. Ce niveau correspond à la colonne 0,05.  $N$  correspond au nombre de points utilisés pour établir la courbe.

Tableau 1. Valeurs critiques pour le coefficient de corrélation de Pearson dans un test unilatéral en fonction des degrés de liberté (N-2)

N-2	0,05	0,025	0,01	0,005
1	0,988	0,997	0,9995	0,9999
2	0,900	0,950	0,980	0,990
3	0,805	0,878	0,934	0,959
4	0,729	0,811	0,882	0,917
5	0,669	0,754	0,833	0,874
6	0,622	0,707	0,789	0,834
7	0,582	0,666	0,750	0,798
8	0,549	0,632	0,716	0,765
9	0,521	0,602	0,685	0,735
10	0,497	0,576	0,658	0,708
11	0,476	0,553	0,634	0,684
12	0,458	0,532	0,612	0,661
13	0,441	0,514	0,592	0,641
14	0,426	0,497	0,574	0,623
15	0,412	0,482	0,558	0,606
16	0,400	0,468	0,542	0,590
17	0,389	0,456	0,528	0,575
18	0,378	0,444	0,516	0,561
19	0,369	0,433	0,503	0,549
20	0,360	0,423	0,492	0,537
21	0,352	0,413	0,482	0,526
22	0,344	0,404	0,472	0,515
23	0,337	0,396	0,462	0,505
24	0,330	0,388	0,453	0,496
25	0,323	0,381	0,445	0,487
26	0,317	0,374	0,437	0,479
27	0,311	0,367	0,430	0,471
28	0,306	0,361	0,423	0,463
29	0,301	0,355	0,416	0,456
30	0,296	0,349	0,409	0,449
35	0,275	0,325	0,381	0,418
40	0,257	0,304	0,358	0,393
45	0,243	0,288	0,338	0,372
50	0,231	0,273	0,322	0,354
60	0,211	0,250	0,295	0,325
70	0,195	0,232	0,274	0,302
80	0,183	0,217	0,256	0,283
90	0,173	0,205	0,242	0,267
100	0,164	0,195	0,230	0,254

Source : Valencia University (Espagne) (5).



## Coefficient linéaire

Le coefficient linéaire ( $Cm$ ) est une mesure de la qualité de l'ajustement par rapport à une droite

$$Cm = \left(1 - \frac{Sm}{m}\right) 100$$

où

$Sm$  = l'écart de la pente et  $m$  = la pente.

- Si des valeurs de référence existent pour le coefficient, le critère d'acceptabilité doit être défini comme la moyenne des valeurs  $Cm$ , notée  $\overline{Cm}$  pour la série de courbes disponible moins  $t_{Student}$  multiplié par l'écart-type de ces valeurs  $Cm$ , noté  $SD_{\overline{Cm}}$  (limite minimale) et 100 (limite maximale) ( $t_{Student}$  obtenu avec le nombre de valeurs utilisées).

$$\overline{Cm} - (t_{Student} \times SD_{\overline{Cm}}) \leq Cm_{current} \leq 100$$

- Si les valeurs de référence ne sont pas disponibles, les méthodes chromatographiques doivent dépasser une valeur  $Cm$  de 0,97 pour être acceptables. Les méthodes non chromatographiques doivent excéder une valeur  $Cm$  de 0,95.

## Pente

La pente (slope) est la tangente de l'angle formé par la ligne droite avec l'axe des abscisses ; elle permet d'évaluer la sensibilité de la réponse obtenue.

- Si des valeurs de référence existent pour la pente, le critère d'acceptabilité doit être défini comme la moyenne des pentes pour la série de courbes disponible moins  $t_{Student}$  multiplié par l'écart-type de ces pentes (limite minimale) et la moyenne de ces pentes pour la série de courbes disponible plus  $t_{Student}$  multiplié par l'écart-type de ces pentes (limite maximale) ( $t_{Student}$  obtenu avec le nombre de valeurs utilisées).

$$\overline{Slope} - (t_{Student} \times SD_{\overline{Slope}}) \leq Slope_{current} \leq \overline{Slope} + (t_{Student} \times SD_{\overline{Slope}})$$

## Contrôles de la qualité sur les points de la courbe d'étalonnage

Une courbe d'étalonnage peut être utilisée pour une période de trois mois au lieu d'utiliser une courbe de travail quotidienne. Pour les mesures quotidiennes durant cette période, au moins deux points sur la courbe doivent être vérifiés (un dans l'intervalle bas et un autre dans l'intervalle haut) avant de passer aux séries de travail.

- Si une méthode a été validée, le résultat obtenu pour le contrôle de ces courbes doit se situer entre les valeurs acceptables dérivées de la validation du point concerné.
- S'il existe une pente de référence mais qu'aucune méthode n'a été validée, le résultat obtenu doit se situer dans l'intervalle :

$$X_{point} \pm (t_{Student} \times SD_{point})$$

où

$X_{point}$  – la valeur moyenne obtenue à la lecture du point

$SD_{point}$  – l'écart-type pour les valeurs obtenues à la lecture du point

$t_{Student}$  – obtenu à partir du nombre de valeurs utilisées pour obtenir le  $SD_{point}$ .



- Si une estimation de la reproductibilité de la méthode est disponible mais qu'il n'existe pas de pente de référence, le résultat obtenu doit se situer dans l'intervalle :

$$V_{\text{point}} \pm (t_{\text{Student}} \times SD_{\text{repro}}), \text{ avec}$$

$V_{\text{point}}$  – la valeur obtenue pour le point de contrôle sur la courbe

$S_{\text{Drepro}}$  – l'écart-type attendu en reproductibilité

$t_{\text{Student}}$  – obtenu à partir du nombre de valeurs utilisées pour obtenir  $SD_{\text{repro}}$ .

### 2.1.5. Analyse des blancs de test

Un blanc de *test initial* doit être analysé avant le début de la série quotidienne d'essais.

Si une méthode a été validée, le résultat obtenu pour le blanc doit être inférieur aux valeurs obtenues pour la limite de détection de la méthode postulée lors de la validation.

Si des analyses de référence pour le blanc sont disponibles mais qu'aucune méthode n'a été validée, le critère d'acceptabilité pour le blanc est que le signal obtenu ne doit pas dépasser la moyenne pour la série de blancs de plus de trois fois l'écart-type de ces valeurs.

Si il n'existe pas d'analyses de référence pour le blanc mais qu'il existe une série de mesures pour des échantillons contenant une concentration très faible de l'analyte en question, le critère d'acceptabilité pour le blanc est que le signal obtenu ne doit pas dépasser trois fois l'écart-type obtenu pour ces échantillons de très faible concentration.

Si la première mesure du blanc initial ne respecte pas les critères d'acceptabilité, le système doit être nettoyé. Un nouveau blanc de test doit être mesuré après ce nettoyage. La procédure doit être répétée jusqu'à obtention d'une valeur acceptable. Une fois que cette valeur acceptable a été obtenue, il faut analyser un deuxième blanc pour confirmer la validité du résultat. Par conséquent, si aucune valeur acceptable n'est obtenue après la mesure du blanc initial, il faut obtenir deux fois de suite des mesures qui respectent les critères d'acceptabilité avant de passer au test de routine.

Un *blanc de test* doit être effectué au moins tous les cinq échantillons, à l'aide des mêmes critères que pour les blancs initiaux.

Si la programmation de la série d'échantillons est automatique et que les résultats sont rassemblés à la *fin de la série*, il peut être nécessaire d'augmenter le nombre de répétitions du blanc (par exemple, trois répétitions consécutives au lieu d'une) pour veiller à obtenir une lecture correcte.

Une série de répétitions de blancs (trois, par exemple) doit être effectuée une fois la série d'échantillons terminée afin de garantir la propreté du système.

### 2.1.6. Réitération

Un échantillon sur 10 doit être retesté à différents moments durant la série. Si l'analyse de l'échantillon est réitérée deux ou trois fois, cela signifie qu'une nouvelle analyse doit être effectuée à deux ou trois reprises. Les résultats doivent être comparés entre eux.

- Si une méthode de validation est disponible, les résultats doivent respecter les critères de reproductibilité obtenus durant la validation.
- Si aucune méthode de validation n'est disponible, un index de compatibilité doit être appliqué :

$$IC = \frac{|x_1 - x_2|}{\sqrt{(2SD_1)^2 + (2SD_2)^2}}$$

Source : ISO/IEC Guide 43-1:2007

où

$x_1$  et  $x_2$  sont les valeurs moyennes obtenues pour chaque répétition de l'échantillon ; et  
 $SD_1$  et  $SD_2$  sont les écart-types obtenus pour les deux ou trois répétitions (ou plus).

- Si l'échantillon est retesté avec une analyse simple plutôt que deux ou trois fois, un écart maximal doit être défini pour chacun des échantillons par rapport à la moyenne (par exemple, un maximum de 10 % de la valeur moyenne) pour que le résultat soit considéré comme acceptable.

### 2.1.7. Contrôles de la qualité

Le laboratoire doit effectuer des contrôles de la qualité pour au moins quatre points situés dans l'intervalle du test : la valeur haute, la valeur centrale, la valeur basse et la limite de quantification. Ces points de contrôle du test doivent différer des points de contrôle de la courbe.

L'un de ces contrôles de la qualité doit être intégré, au hasard, tous les cinq échantillons afin de veiller à ce que la totalité d'entre eux aient été suffisamment analysés dans le cadre de la procédure menée par le laboratoire. Dans tous les cas, et si les valeurs pour tous les échantillons à analyser se retrouvent dans un intervalle très étroit, le contrôle de la qualité peut être répété pour le point le plus proche de l'intervalle d'échantillons.

- Si une méthode a été validée, les résultats doivent respecter les critères pour les points de contrôle de la qualité obtenus durant la validation.
- Si des résultats de référence pour les points de contrôle sont disponibles mais qu'il n'existe pas de méthode de validation, le critère d'acceptabilité est que la valeur pour le contrôle de la qualité doit s'inscrire dans l'intervalle

$$X_{\text{point}} \pm (t_{\text{Student}} \times SD_{\text{point}})$$

avec

$X_{\text{point}}$  – la valeur moyenne obtenue à la lecture du point de contrôle ;

$SD_{\text{point}}$  – l'écart-type pour les valeurs obtenues à la lecture du point de contrôle ; et

$t_{\text{Student}}$  – obtenu à partir du nombre de valeurs utilisées.

- Si des résultats de référence ne sont pas disponibles, un écart maximum par rapport à la moyenne doit être défini pour chacun des échantillons (par exemple, un maximum de 10 % de la valeur moyenne) pour que le résultat soit considéré comme acceptable.

### Échantillons en aveugle

Le laboratoire doit tester des échantillons à l'aveugle au moins une fois par an. Pour cela, le responsable de laboratoire doit préparer des échantillons contenant une certaine concentration d'un analyte pour qu'ils soient analysés (la concentration n'est pas connue du personnel). Ces échantillons doivent être préparés à l'aide d'étalons certifiés, de restes d'échantillons provenant d'exercices d'intercomparaisons et d'échantillons bien caractérisés.

- Si une méthode a été validée, la valeur réelle pour l'échantillon doit s'inscrire dans l'intervalle

$$V_{\text{SBlind}} \pm I_{\text{test}}$$

avec

$V_{\text{SBlind}}$  – la valeur obtenue lors de l'analyse de l'échantillon en aveugle ; et

$I_{\text{test}}$  – l'incertitude élargie obtenue durant la validation de la méthode.

- Si des valeurs de reproductibilité sont disponibles pour la méthode mais qu'aucune méthode de validation n'est disponible, la valeur réelle de l'échantillon doit s'inscrire dans l'intervalle

$$V_{S\text{Blind}} \pm (t_{\text{Student}} \times SD_{\text{repro}})$$

avec

$V_{S\text{Blind}}$  – la valeur obtenue lors de l'analyse de l'échantillon en aveugle ;

$SD_{\text{Repro}}$  – la valeur obtenue pour l'écart-type avec la reproductibilité ; et

$t_{\text{Student}}$  – obtenu à partir du nombre de valeurs utilisées pour obtenir  $SD_{\text{repro}}$ .

- Si aucune autre valeur n'est disponible, un écart maximum par rapport à la valeur réelle doit être défini afin d'accepter le résultat. Cet écart peut être estimé à partir des études scientifiques ou en fonction des expériences précédentes du laboratoire avec des méthodes ou analytes similaires.

## 2.2. Contrôles externes de la qualité

Les comparaisons interlaboratoires<sup>1</sup> établies aux échelles nationale, régionale et mondiale sont largement utilisées à différentes fins. Voici des exemples illustrant à quoi servent ces comparaisons interlaboratoires :

- évaluer la performance des laboratoires en matière de tests ou de mesures spécifiques et effectuer un suivi de cette performance dans le temps ;
- identifier des problèmes dans les laboratoires qui, par exemple, peuvent être liés à des procédures de tests ou de mesure inappropriées, à une formation et une supervision du personnel inadéquates ou à un mauvais étalonnage du matériel et mettre en place des solutions d'amélioration ;
- vérifier l'efficacité et la comparabilité des méthodes de test ou de mesure ;
- renforcer la confiance des clients des laboratoires ;
- déterminer les différences entre laboratoires ;
- donner des instructions aux laboratoires participants sur la base des résultats de ces comparaisons ;
- valider les estimations d'incertitude calculées ;
- évaluer les caractéristiques opérationnelles d'une méthode ;
- attribuer une valeur aux matériaux de référence et évaluer la pertinence de leur utilisation pour des procédures de test ou de mesure spécifiques ; et
- appuyer les déclarations d'équivalence de mesure fournies par les instituts nationaux de métrologie grâce aux comparaisons essentielles ou à des comparaisons complémentaires effectuées pour le compte du Bureau international des poids et mesures et d'autres associations de métrologie.

Les procédures décrites ci-dessous sont principalement applicables aux laboratoires organisant une étude d'intercomparaisons, par exemple les laboratoires de référence au niveau national. Elles peuvent aussi tout à fait être suivies par les participants aux études de comparaisons interlaboratoires<sup>2</sup>.

Les essais d'aptitude<sup>3</sup> s'appuient sur les comparaisons interlaboratoires pour déterminer la performance des laboratoires, comme indiqué dans les points i) à vii). Les essais d'aptitude ne concernent généralement pas les finalités viii), ix) et x) car l'on part du postulat que ces applications

<sup>1</sup> Comparaisons interlaboratoires : organisation, déroulement et évaluation des mesures effectuées sur des éléments identiques ou similaires par deux laboratoires ou plus dans des conditions prédéterminées.

<sup>2</sup> Participant : laboratoire, organisation ou personne qui reçoit les échantillons de l'essai d'aptitude et envoie les résultats pour qu'ils soient étudiés par l'organisateur de l'essai.

<sup>3</sup> Essai d'aptitude : évaluation des performances des participants grâce à des comparaisons interlaboratoires en fonction de critères préalablement établis.

sont maîtrisées par les laboratoires. Toutefois, ils peuvent être utilisés pour fournir une preuve indépendante des compétences d'un laboratoire.

Voici les étapes préalables au déroulement d'un essai de comparaison entre laboratoires :

- attribuer une valeur à l'échantillon ;
- déterminer le paramètre d'écart-type pour l'essai d'aptitude, lequel sera nécessaire pour les calculs dans l'exercice ;
- déterminer le nombre de répétitions à effectuer pour chaque participant ; et
- confirmer la validité de l'échantillon à analyser grâce à des tests d'homogénéité et de stabilité. Ces paramètres doivent être calculés par l'organisateur de l'exercice.

Avant d'envoyer les échantillons aux participants, l'organisateur doit préparer des instructions détaillées et documentées.

L'organisateur doit bien entendu, définir le nombre d'échantillons requis pour effectuer l'exercice, en tenant compte du nombre de participants, des tests d'homogénéité et de stabilité qui doivent être effectués, des possibles répétitions sur l'échantillon et des pertes ou dommages durant la phase de transport. Par conséquent, il est conseillé de prévoir une quantité d'échantillon supérieure au nombre calculé.

### 2.2.1. Attribuer une valeur à l'échantillon

Les critères utilisés pour obtenir la valeur à laquelle seront comparés les résultats envoyés par les laboratoires doivent être définis avant le début de l'exercice. Ces critères sont les suivants.

- La valeur pour un matériau de référence certifié ou un échantillon enrichi est obtenue grâce aux méthodes suivantes :
  - un échantillon du matériau de référence certifié est utilisé pour l'essai d'aptitude ; la valeur de la propriété et le degré d'incertitude de cette valeur doivent être connus ; ou
  - un échantillon enrichi avec des quantités de la substance testée est utilisé ; l'enrichissement peut être effectué par l'organisateur ou par le laboratoire participant à l'aide de solutions concentrées fournies par l'organisateur.
- Le résultat est obtenu à partir de la valeur moyenne obtenue par un groupe de laboratoires experts qui ont testé le ou les échantillon(s) à l'aide de méthodes de test préalablement acceptées qui peuvent être considérées comme des méthodes « absolues » ou « de référence ». Les résultats atypiques doivent être éliminés avant de calculer la moyenne.
- Le résultat est obtenu à partir de la valeur moyenne calculée par le groupe de laboratoires participants après élimination des valeurs atypiques ou à partir de la moyenne obtenue à l'aide de méthodes statistiques robustes (comme l'algorithme A ; voir ci-dessous). Il s'agit d'une méthode plus risquée pour les systèmes de comparaisons en accès libre, car les données erronées peuvent influencer sur la moyenne, ce qui signifie que l'élimination des anomalies doit être efficace.

### 2.2.2. Déterminer l'écart-type $\hat{\sigma}^4$ pour les essais d'aptitude

Plusieurs options peuvent être utilisées pour attribuer la valeur de l'écart-type pour les essais d'aptitude.

<sup>4</sup> Écart-type pour les essais d'aptitude : mesure de la dispersion utilisée pour évaluer les résultats d'un essai d'aptitude en fonction des informations disponibles.

### Valeur par prescription

L'écart-type pour les essais d'aptitude peut être défini en fonction de valeurs étalons. Cette option a l'avantage de bien représenter l'objectif de cette méthode.

### Valeur par perception

L'écart-type pour les essais d'aptitude peut être calculé en fonction des expériences préalables du coordinateur et de ses collaborateurs à l'aide de valeurs obtenues par le passé.

Lorsque l'écart-type pour les essais d'aptitude ( $\hat{\sigma}$ ) est obtenu par prescription ou par perception, il est possible que la valeur choisie ne soit pas réaliste en matière de reproductibilité de la méthode de mesure. Le test suivant peut donc être effectué pour vérifier que la valeur de  $\hat{\sigma}$  corresponde bien aux valeurs de répétabilité et de reproductibilité obtenues à l'aide de la méthode. Étant donné

$\hat{\sigma}_R$  – l'écart-type de la reproductibilité, et

$\hat{\sigma}_r$  – l'écart-type de la répétabilité,

$$\sigma_L = \sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2}$$

l'écart-type interlaboratoire est calculé par la formule suivante :

$$\hat{\sigma} = \sqrt{(\phi \times \sigma_L)^2 + \left(\frac{\sigma_r^2}{n}\right)}$$

La valeur du facteur  $\phi$  est donc calculée en substituant les valeurs de  $\sigma_L$  et  $\sigma_r$  et la valeur choisie pour  $\hat{\sigma}$  dans l'équation suivante :

où  $n$  est le nombre de répétitions de l'analyse effectué par chaque laboratoire.

Si la valeur obtenue pour  $\phi$  est inférieure à 0,5, la valeur choisie pour  $\hat{\sigma}$  correspond à un degré de reproductibilité que les laboratoires seront incapables d'atteindre en pratique, et donc cette valeur doit être augmentée.

### Valeur basée sur un modèle général

La valeur de l'écart-type pour les essais d'aptitude peut être dérivée de la valeur de la reproductibilité obtenue pour la méthode de mesure.

Par exemple, Horowitz a proposé le modèle suivant pour évaluer l'écart-type de la reproductibilité à l'aide de la concentration :

$$\sigma_R = 0,02 c^{0,8495}$$

où  $c$  est la concentration de la mesure à déterminer en pourcentage (fraction massique).

### Valeur basée sur les valeurs de répétabilité et de reproductibilité obtenues

Lorsque les valeurs pour les écart-types de reproductibilité et de répétabilité sont disponibles, l'écart-type pour les essais d'aptitude peut être calculé de la manière suivante. Étant donné

$\sigma_R$  – l'écart-type de la reproductibilité, et

$\sigma_r$  – l'écart-type de la répétabilité,

L'écart-type interlaboratoire est calculé selon la formule suivante :

$$\sigma_L = \sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2}$$

La valeur de  $\hat{\sigma}$  est calculée de la manière suivante :

$$\hat{\sigma} = \sqrt{\sigma_L^2 + \left(\frac{\sigma_r^2}{n}\right)}$$

où  $n$  est le nombre de répétitions de l'analyse effectué par chaque laboratoire.

### Valeur basée sur les données obtenues lors d'un cycle de l'essai d'aptitude

La valeur de l'écart-type pour les essais d'aptitude peut être calculée à partir de la valeur dérivée des résultats communiqués par les participants lors de ce cycle de l'essai d'aptitude. L'écart-type doit être l'écart-type robuste des résultats communiqués par tous les participants, comme calculé par l'algorithme A.

Classer les données  $p$  dans l'ordre croissant :

$x_1, x_2, \dots, x_i, \dots, x_p$

Classer les moyennes robustes et les écart-types robustes ( $x^*$  et  $s^*$ ) pour ces données.

Les valeurs initiales pour  $x^*$  et  $s^*$  sont :

$x^* = \text{médiane de } x_i \quad (i = 1, 2, \dots, p)$

$s^* = 1,483 \text{ médiane de } |x_i - x^*| \quad (i = 1, 2, \dots, p)$

Mettre à jour les valeurs de  $x^*$  et  $s^*$  comme suit. Calculer :

$\delta = 1,5 s^*$

Pour chaque  $x_i$  ( $i = 1, 2, \dots, p$ ), calculer :

$$x_i^* = \begin{cases} x^* - \delta, & \text{si } x_i < x^* - \delta \\ x^* + \delta, & \text{si } x_i > x^* + \delta \\ x_i, & \text{para otro} \end{cases}$$

Maintenant, calculer à nouveau les nouvelles valeurs pour  $x^*$  et  $s^*$  à l'aide de la formule suivante :

$$x^* = \sum \frac{x_i^*}{p}$$

$$s^* = 1,134 \sqrt{\frac{\sum (x_i^* - x^*)^2}{(p - 1)}}$$

Incrémenter  $i$ .

L'estimation robuste de  $x^*$  et  $s^*$  est dérivée d'un calcul itératif jusqu'à parvenir à la convergence. On atteint la convergence lorsqu'aucun changement ne se produit entre une itération et la suivante dans le troisième chiffre significatif de l'écart-type robuste et le chiffre équivalent de la moyenne robuste. Il est possible de programmer un ordinateur pour utiliser cette méthode.

### 2.2.3. Critères pour déterminer le nombre de mesures que devra effectuer chaque laboratoire participant

Des variations dans la répétabilité de la méthode signifient que des biais peuvent apparaître lors des essais d'aptitude. Lorsque la variation de répétabilité est trop importante comparée à l'écart-type des essais d'aptitude, il y a un risque d'obtenir des résultats non fiables. Dans ce cas, un laboratoire peut avoir un facteur de biais très élevé lors d'un cycle mais pas lors du suivant, ce qui fait qu'il est encore plus compliqué de trouver la cause.

Pour limiter l'influence des variations en matière de répétabilité, le nombre de réplicats ( $n$ ) effectués par chaque laboratoire doit être choisi afin que :

$$\frac{\sigma_r}{\sqrt{n}} \leq 0,3 \hat{\sigma}$$

avec

$\sigma_r$  – l'écart-type de la répétabilité établi avant l'exercice (soit par un exercice expérimental interlaboratoires, soit par le laboratoire qui organise l'essai).

Si cette condition est remplie, l'écart-type de la répétition ne représente pas plus de 10 % de l'écart-type des essais d'aptitude.

En outre, tous les laboratoires participants doivent effectuer le même nombre de réplicats lorsqu'ils participent à des tests de comparaison interlaboratoires.

### 2.2.4. Déroulement du test d'homogénéité<sup>5</sup>

Lorsqu'il est acceptable de ne pas effectuer le test d'homogénéité pour tous les grandeurs mesurées, il faudra choisir une méthode de mesure et une grandeur mesurée caractéristique qui soient suffisamment sensibles à l'hétérogénéité des échantillons.

Préparer et emballer les échantillons pour un cycle d'essai d'aptitude, en veillant à ce qu'il y ait suffisamment d'échantillons pour effectuer à la fois l'essai et les tests d'homogénéité.

Choisir un nombre ( $g$ ) d'échantillons emballés au hasard, où  $g \geq 10$ . Le nombre d'échantillons inclus dans le test d'homogénéité peut être réduit si des données de référence pour ces tests sont disponibles, à condition que ceux-ci aient été effectués selon le même protocole.

Préparer deux portions à tester avec chaque échantillon, en essayant de minimiser les différences entre chaque test.

Prendre ces portions  $2g$  au hasard et effectuer le test pour chacune d'entre elles, en réalisant la série de test dans des conditions de répétabilité.

Calculer la moyenne ( $\bar{x}$ ) de l'écart-type intraéchantillon ( $s_w$ ) et celle de l'écart-type interéchantillons ( $s_b$ ) comme suit.

Les données pour un test d'homogénéité sont représentées par  $x_{t,k}$

où

$t$  représente l'échantillon ( $t = 1, 2, \dots, g$ ) et  $k$  représente la portion de l'échantillon ( $k = 1, 2$ ).

La moyenne pour chaque échantillon est définie par :

$$x_{t,.} = \frac{x_{t,1} + x_{t,2}}{2}$$

<sup>5</sup> Selon la norme 13528:2005 de l'Organisation internationale de normalisation.

et l'intervalle des portions inter-test par :

$$w_t = |x_{t,1} - x_{t,2}|$$

La moyenne générale est calculée comme suit :

$$\bar{x}_{..} = \sum \bar{x}_{t.}/g$$

L'écart-type de la moyenne générale est calculé comme suit :

$$s_x = \sqrt{\sum (x_{t.} - \bar{x}_{..})^2 / (g - 1)}$$

L'écart-type intraéchantillon est calculé selon la formule suivante :

$$s_w = \sqrt{\sum w_t^2 / (2g)}$$

lorsque la somme couvre tous les échantillons ( $t = 1, 2, \dots, g$ ).

Enfin, pour calculer l'écart-type interéchantillons, la formule est la suivante :

$$s_s = \sqrt{s_x^2 - (s_w^2/2)}$$

### Critères d'évaluation pour le test d'homogénéité

Comparer l'écart-type interéchantillons ( $s_s$ ) avec l'écart-type requis pour l'essai d'aptitude ( $\hat{\sigma}$ ). Les échantillons respectent un critère d'homogénéité approprié si :

$$s_s \leq 0,3 \hat{\sigma}.$$

Si ce critère est respecté, l'écart-type interéchantillons ne représente pas plus de 10 % de l'écart-type global de l'essai d'aptitude. Si ce critère n'est pas respecté, le coordinateur peut envisager l'une des possibilités suivantes.

- La méthode utilisée pour préparer les échantillons pourrait être examinée afin de mettre en place toute amélioration nécessaire.
- Un certain nombre d'échantillons pourraient être distribués à chaque participant à l'exercice de comparaisons interlaboratoires pour effectuer des mesures sur chaque échantillon. L'hétérogénéité de ces échantillons augmentera l'écart-type intraéchantillon jusqu'à une certaine valeur :

$$\sigma_{r1} = \sqrt{\sigma_r^2 + s_s^2}$$

Cette valeur  $\sigma_{r1}$  peut être utilisée pour augmenter le nombre de réplicats pour chaque participant à l'exercice.

L'écart-type interéchantillons pourrait être inclus dans l'écart-type pour l'essai d'aptitude, en calculant  $\hat{\sigma}$  avec

$$\hat{\sigma} = \sqrt{\hat{\sigma}_1^2 + s_s^2}$$

où

$\hat{\sigma}_1$  est l'écart-type pour l'essai d'aptitude sans inclure aucune tolérance pour l'hétérogénéité des échantillons.



### 2.2.5. Déroulement du test de stabilité

Le laboratoire qui effectue le test d'homogénéité doit également effectuer les tests de stabilité. Il convient d'utiliser la même méthode et le même produit que lors des tests d'homogénéité.

Il faut effectuer ces tests de stabilité après ceux d'homogénéité. Le temps écoulé entre ces deux tests doit refléter l'estimation du temps écoulé entre la préparation des échantillons pour l'exercice de comparaisons interlaboratoires et la période maximale pendant laquelle les participants peuvent rendre leurs résultats.

Prendre un nombre ( $g$ ) d'échantillons, où  $g \geq 3$ .

Préparer deux portions à tester pour chaque échantillon, comme pour le test d'homogénéité.

Prendre les 2 portions  $g$  au hasard pour obtenir un résultat de mesure  $y_{t,k}$  pour chaque échantillon, en effectuant toutes les mesures dans des conditions de répétabilité.

Calculer la moyenne  $y$  (.,.) pour toutes les mesures.

Critères d'évaluation pour le test de stabilité

Comparer la moyenne obtenue lors du test d'homogénéité avec la moyenne obtenue lors du test de stabilité. On considère que les échantillons sont stables si :

$$|\bar{x}_{..} - \bar{y}_{..}| \leq 0,3 \hat{\sigma}$$

Si ce critère n'est pas respecté, la méthode de préparation et de conservation des échantillons doit être évaluée et améliorée, si possible.

### 2.2.6. Instructions pour les participants

Avant d'envoyer les articles de l'essai d'aptitude, l'organisateur de l'essai informera les participants suffisamment à l'avance de la date d'arrivée prévue des articles et de la date butoir à laquelle les résultats devront être envoyés par le laboratoire participant.

L'organisateur doit fournir des instructions détaillées et documentées à tous les participants. Ces instructions comprendront :

- l'obligation de traiter les articles de l'essai d'aptitude de la même manière que la majorité des échantillons testés normalement (sauf si le programme exige spécifiquement un traitement particulier) ;
- les conditions de conservation ;
- les méthodes de test à utiliser, ou autorisées, le cas échéant ;
- la procédure à suivre pour préparer et conserver les articles de l'essai d'aptitude ;
- les instructions de manipulation, y compris les précautions à prendre ;
- l'environnement spécifique dans lequel l'essai doit se dérouler et, si nécessaire, l'obligation de décrire les conditions pertinentes dans lesquelles se déroulent le mesurage ;
- des instructions spécifiques concernant la manière dont les résultats doivent être communiqués (par exemple les unités de mesure, le nombre de chiffres significatifs ou de décimales) et des instructions concernant l'incertitude du résultat (si nécessaire) ; dans le dernier cas, le coefficient de couverture et si possible, la probabilité de ce coefficient doit être incluse ;
- la date butoir pour communiquer les résultats ;
- les informations de contact de l'organisateur pour soumettre toute question ; et
- les instructions de renvoi des articles de l'essai d'aptitude (si nécessaire).

## 2.2.7. Calcul des paramètres statistiques pour les résultats de l'essai d'aptitude

### Estimation du biais des participants

Si  $x$  est le résultat (ou la moyenne des résultats) communiqué par un participant pour la mesure de l'un des paramètres à déterminer lors d'un cycle d'essai d'aptitude, le biais ( $D$ ) peut être calculé comme suit :

$$D = x - X$$

où

$X$  est la valeur assignée.

Si un participant obtient un résultat avec un biais supérieur à  $3,0 \hat{\sigma}$  ou inférieur à  $-3,0 \hat{\sigma}$ , le résultat sera considéré et traité comme un « signal d'action ». De même, si un participant obtient un résultat qui donne un biais supérieur à  $2,0 \hat{\sigma}$  ou inférieur à  $-2,0 \hat{\sigma}$ , le résultat sera considéré et traité comme un « signal d'alerte ».

L'apparition d'un signal d'action ou de deux signaux d'alerte consécutifs signifie que le laboratoire doit étudier les biais de ses résultats.

### Différences de pourcentage

Si  $x$  est le résultat (ou la moyenne des résultats) communiqué par un participant pour la mesure de l'un des paramètres à déterminer lors d'un cycle d'essai d'aptitude, la différence de pourcentage ( $D\%$ ) peut être calculée comme suit :

$$D\% = 100 (x - X)/X$$

où

$X$  est la valeur assignée.

Si un participant obtient un résultat avec une différence de pourcentage supérieure à  $300 \hat{\sigma}/X\%$  ou inférieure à  $-300 \hat{\sigma}/X\%$ , le résultat sera considéré et traité comme un signal d'action. De même, si un participant obtient un résultat qui donne une différence de pourcentage supérieure à  $200 \hat{\sigma}/X\%$  ou inférieure à  $-200 \hat{\sigma}/X\%$ , le résultat sera considéré et traité comme un signal d'alerte.

L'apparition d'un signal d'action ou de deux signaux d'alerte consécutifs signifie que le laboratoire doit étudier les biais de ses résultats.

## 2.2.8. Score $z$

La valeur du score  $z$  est calculée de la manière suivante :

$$z = \frac{(x - X)}{\hat{\sigma}}$$

avec

$x$  – la valeur rapportée par le participant

$X$  – la valeur assignée, et

$\hat{\sigma}$  – l'écart-type pour l'essai d'aptitude.

Si un participant obtient un résultat qui donne un score  $z$  supérieur à  $3,0 \hat{\sigma}$  ou inférieur à  $-3,0 \hat{\sigma}$ , le résultat sera considéré et traité comme un signal d'action. De même, si un participant obtient un résultat qui donne un score  $z$  supérieur à  $2,0 \hat{\sigma}$  ou inférieur à  $-2,0 \hat{\sigma}$ , le résultat sera considéré et traité comme un signal d'alerte.

Si l'essai d'aptitude compte un nombre restreint de participants (par exemple, moins de 10 laboratoires), il convient d'évaluer avec précaution la signification du calcul du score z pour des cycles individuels. Dans ce cas, il est préférable de traiter l'ensemble des résultats sur plusieurs cycles pour évaluer les performances de chaque laboratoire.

### 2.2.9. Nombre $E_n$

Ce paramètre est calculé de la manière suivante :

$$E_n = \frac{x - X}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{ref}^2}}$$

avec

$X$  - la valeur assignée

$U_{ref}$  - l'incertitude élargie de  $X$

$U_{lab}$  - l'incertitude élargie de  $x$ , le résultat obtenu par le participant.

Une valeur supérieure à 1,0 ou inférieure à -1,0 revient à une valeur de score z supérieure ou inférieure à 2,0 respectivement, et par conséquent, un tel résultat doit être traité comme décrit dans l'évaluation du score z.

### 2.2.10. Score $z'$

La valeur du score  $z'$  est calculée de la manière suivante :

$$z' = \frac{(x - X)}{\sqrt{\hat{\sigma}^2 + u_x^2}}$$

où

$u_x$  - l'incertitude (non élargie) de la valeur assignée  $X$ .

Les résultats du score  $z'$  sont interprétés comme les valeurs du score z.

Une comparaison entre le score z et le score  $z'$  montre que les valeurs du score  $z'$  lors du cycle de l'essai peuvent être inférieures aux valeurs du score z correspondantes, avec un facteur constant de

$$\frac{\hat{\sigma}}{\sqrt{\hat{\sigma}^2 + u_x^2}}$$

Si

$$0,96 \leq \frac{\hat{\sigma}}{\sqrt{\hat{\sigma}^2 + u_x^2}} \leq 1,00$$

alors le score  $z'$  sera très proche du score z, auquel cas l'on peut conclure que l'incertitude de la valeur assignée est négligeable.

### 2.2.11. Score zéta( $\zeta$ )

Ce paramètre peut être utilisé seulement si la valeur assignée à l'essai d'aptitude n'a pas été calculée à l'aide des résultats des laboratoires participants.

$$zeta\ score = \frac{(x - X)}{\sqrt{u_x^2 + u_X^2}}$$

avec

$u_x$  – la valeur de l'incertitude standard (non élargie) estimée par le laboratoire participant, et

$u_X$  – l'incertitude standard (non élargie) de la valeur assignée X.

Le score ( $\zeta$ ) est interprété comme le score z.

Si l'on obtient de manière successive des scores ( $\zeta$ ) supérieurs à 3,0, cela peut signifier que le participant sous-estime les sources d'incertitude.

Si le laboratoire présente un biais important et l'intervalle d'incertitude  $X \pm U_x$  n'inclut pas la valeur assignée, l'on obtiendra également des valeurs très élevées pour le score ( $\zeta$ ).

### 2.2.12. Score $E_z$

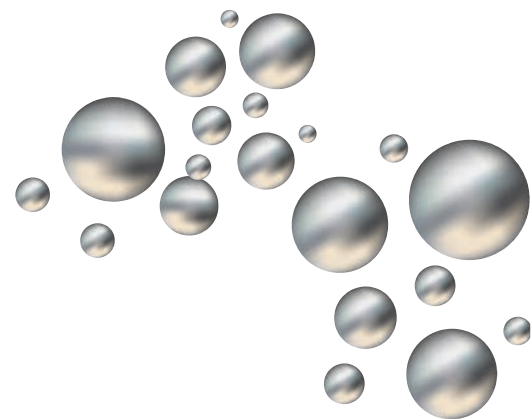
Le score  $E_z$  est calculé comme suit

$$E_{Z-} = \frac{x - (X - U_x)}{U_x}$$

$$E_{Z+} = \frac{x - (X + U_x)}{U_x}$$

Pour ces calculs, on utilise l'incertitude élargie.

- Si les deux valeurs ( $E_{z-}$  et  $E_{z+}$ ) s'inscrivent dans l'intervalle allant de -1,0 à 1,0, le résultat est considéré comme étant satisfaisant.
- Si l'une des deux valeurs  $E_z$  s'inscrit dans l'intervalle allant de -1,0 à 1,0, le résultat est incertain.
- Si les deux valeurs sont inférieures à -1,0 ou supérieures à 1,0, le résultat est insatisfaisant.



### 3. Évaluation des résultats du laboratoire

Chaque laboratoire peut évaluer sa performance à l'aide de la liste de contrôle de l'Annexe 3, qui contient une série de questions organisées en différentes sections pour rassembler des données sur les laboratoires ainsi que les critères pour mener cette évaluation. Des informations sur le matériel, le niveau d'expertise, les participations précédentes à des études d'interétalonnage et l'accréditation doivent donc être collectées aux fins de cette évaluation.



## 4. Références et bibliographie

### Références

1. National Research Council of the National Academies. Human biomonitoring for environmental chemicals, Washington, National Academies Press, 2006. <https://www.nap.edu/catalog/11700/human-biomonitoring-for-environmental-chemicals>.
2. Calafat A. M. et Needham L. L., What additional factors beyond state-of-the-art analytical methods are needed for optimal generation and interpretation of biomonitoring data?, *Environ Health Perspect*, 2009, 117:1481–5.
3. Cornellis R., Heinzow B., Herber R. F. M., Christensen J. M., Poulsen O. M., Sabbioni E. et al., Sample collection guidelines for trace elements in blood and urine, *Pure Appl Chem*, 1995, 67(8–9):1575–608.
4. Final Report Summary – COPHES (European coordination action on human biomonitoring). Brussels: European Commission, Community Research and Development Information Service; 2013 ([https://cordis.europa.eu/result/rcn/58554\\_en.html](https://cordis.europa.eu/result/rcn/58554_en.html), accessed 28 February 2018).
5. Melia JL. Valencia: Valencia University Research Unit of Psychometrics; 2009 (<http://www.uv.es/meliajl/Docencia/Tablas/TablaR.PDF>, accessed 28 February 2018).

### Bibliographie

Organisation internationale de normalisation [site Web], Genève : Organisation internationale de normalisation, 2018 (<https://www.iso.org/standards-catalogue/browse-by-ics.html>, dernier accès le 31 janvier 2018).

ISO/IEC 17025:2005 Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais.

ISO/IEC Guide 43-1:1997 Essais d'aptitude des laboratoires par intercomparaison -- Partie 1 : développement et mise en œuvre de systèmes d'essais d'aptitude.

ISO/IEC Guide 43-2:1997 Essais d'aptitude des laboratoires par intercomparaison -- Partie 2 : sélection et utilisation de systèmes d'essais d'aptitude par des organismes d'accréditation de laboratoires.

ISO 13528 Méthodes statistiques utilisées dans les essais d'aptitude par comparaison interlaboratoires.

ISO Guide 33, deuxième édition, Matériaux de référence, Bonne pratique d'utilisation des matériaux de référence.

G-ENAC-99; second edition. Cuestionario de autoevaluación de cumplimiento de la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 para laboratorios [Self-assessment questionnaire for compliance with UNE EN ISO / IEC 17025: 2005 standard for laboratories]. Madrid: Entidad Nacional de Acreditación [National Accreditation Entity]; 2018 (<https://www.enac.es/>, accessed 7 February 2018).

# Annexe 1. Enregistrement de la réception d'un échantillon

## 1. ORIGINE DE L'ÉCHANTILLON :

Centre :

Ville/Pays :

Date du prélèvement :

## 2. ÉCHANTILLON REÇU :

 Urine Cheveux Sang ombilical

Signature de l'analyste :

## 3. RÉCEPTION DE L'ÉCHANTILLON:

Date  
(jj/mm/aa)Heure  
(hh:mm)

### A) EMBALLAGE

 AUCUN PROBLÈME DÉTECTÉ PROBLÈME DÉTECTÉ : Emballage endommagé Agents de refroidissement décongelés Autres : \_\_\_\_\_

### B) ÉCHANTILLONS

 AUCUN PROBLÈME DÉTECTÉ PROBLÈME DÉTECTÉ : Échantillon renversé/flacon cassé Quantité insuffisante/volume insuffisant (préciser la matrice)\_\_\_ Incohérence dans les codes ID Autres : \_\_\_\_\_

### C) DOCUMENTS

 AUCUN PROBLÈME DÉTECTÉ PROBLÈME DÉTECTÉ : Absence du registre des échantillons collectés Absence du questionnaire sur le prélèvement de cheveux Absence du questionnaire sur le prélèvement d'urine Absence du questionnaire sur le prélèvement de sang ombilical Absence du questionnaire sur l'étude Incohérence dans les codes ID Autres : \_\_\_\_\_

## 4. DATE DE DÉPÔT/DE MISE EN BANQUE :

## 5. COMMENTAIRES :

### CODES ID DES ÉCHANTILLONS CONNEXES

Urine    Cheveux    Sang ombilical

## Annexe 2. Enregistrement des échantillons collectés

ORIGINE :          CENTRE : ADRESSE : VILLE/PAYS : CONTACT (NOM ET TÉLÉPHONE) :			
Code ID	Date de prélèvement (jj/mm/aa)	Questionnaire sur le prélèvement attaché (O/N)	Commentaires

Date d'expédition :  
 Nom et signature de l'agent de terrain :



# Annexe 3. Auto-évaluation des compétences du laboratoire

## Questionnaire d'évaluation du laboratoire

INFORMATIONS GÉNÉRALES
------------------------

### 1. Données sur la personne remplissant le questionnaire

Nom : .....

Poste : .....

Entreprise : .....

Adresse : .....

Ville : .....

Code postal : .....

Pays : .....

Courriel : .....

Téléphone : .....

### 2. Quelles analyses effectuez-vous dans votre laboratoire ?

Mercure dans les cheveux     Mercure dans l'urine     Mercure dans le sang ombilical

### 3. Quelle(s) technique(s) d'analyse utilisez-vous ?

.....

### 4. Veuillez préciser le type, le fabricant et le modèle de votre appareil d'analyse.

.....

### 5. Quelle est la quantité minimale de cheveux/d'urine/de sang requise pour effectuer des mesures ? En mg ou en ml

.....

RENSEIGNEMENTS SUR LA MÉTHODE

6. La procédure d'analyse pour le mercure dans les cheveux/l'urine/le sang ombilical est-elle accréditée ?

Non       Oui

Si oui, veuillez préciser votre numéro d'annexe technique :

.....

7. Avez-vous une procédure opératoire standardisée pour la validation des méthodes d'analyse ?

Non       Oui

8. Y a-t-il une procédure opératoire standardisée pour l'analyse du mercure dans ..... dans votre laboratoire ?

Non       Oui

9. Avez-vous une méthode validée pour l'analyse du mercure dans ..... ?

Non       Oui

10. Veuillez renseigner les champs suivants concernant votre méthode d'analyse.

Répétabilité intersérie .....%

Limite de quantification .....

Limite de détection .....

Exactitude .....

Incertitude .....

11. Comment calculez-vous votre répétabilité intersérie ?

.....

12. Comment calculez-vous la limite de quantification ?

.....

13. Comment calculez-vous la limite de détection ?

.....

14. Comment calculez-vous l'exactitude ?

.....

15. Quels éléments utilisez-vous pour calculer votre incertitude ?

.....

CONTRÔLE DE LA QUALITÉ
------------------------

**16. Avez-vous un système de contrôle interne de la qualité ?**

Non  Oui

**17. Utilisez-vous les méthodes de contrôle de la qualité suivantes ?**

.....

Contrôle sur ligne droite <sup>6</sup>	<input type="checkbox"/> Non	<input type="checkbox"/> Oui <i>Veillez préciser la fréquence</i> .....
Coefficient de corrélation	<input type="checkbox"/> Non	<input type="checkbox"/> Oui
Coefficient linéaire	<input type="checkbox"/> Non	<input type="checkbox"/> Oui
Pente	<input type="checkbox"/> Non	<input type="checkbox"/> Oui
Blancs	<input type="checkbox"/> Non	<input type="checkbox"/> Oui <i>Veillez préciser la fréquence</i> .....
Contrôles de la qualité	<input type="checkbox"/> Non	<input type="checkbox"/> Oui <i>Veillez préciser la fréquence</i> .....
Échantillons en aveugle	<input type="checkbox"/> Non	<input type="checkbox"/> Oui <i>Veillez préciser la fréquence</i> .....
Double analyse des échantillons	<input type="checkbox"/> Non	<input type="checkbox"/> Oui <i>Veillez préciser la fréquence</i> .....

**18. Utilisez-vous des matériaux de référence certifiés ?**

Non  Oui *Veillez préciser le fabricant et la concentration :*

.....

**19. Utilisez-vous des matériaux de référence ?**

Non  Oui *Veillez préciser le fabricant et la concentration :*

.....

**20. Utilisez-vous du matériel étalonné/vérifié ?**

Non  Oui

**21. Avez-vous un plan ou un programme annuel d'étalonnage du matériel ?**

Non  Oui

**22. Avez-vous accès à un registre décrivant les conditions de stockage des échantillons, lorsque cela est nécessaire ?**

Non  Oui *Veillez préciser le fabricant et la concentration :*

.....

**23. Avez-vous un programme annuel de comparaisons interlaboratoires ?**

Non  Oui

<sup>6</sup> Ceci concerne la fréquence de l'étalonnage afin de confirmer que les paramètres de la courbe remplissent les critères de validation définis.

24. À quelle fréquence participez-vous à ces activités ? (Veuillez indiquer l'organisateur et le nombre de participations par année)

.....

25. L'évaluation de vos résultats obtenus lors des comparaisons interlaboratoires repose sur :

- |                 |                              |  |
|-----------------|------------------------------|--|
| le score z      | <input type="checkbox"/> Non | <input type="checkbox"/> Oui                               |
| le nombre $E_n$ | <input type="checkbox"/> Non | <input type="checkbox"/> Oui                               |
| le score z'     | <input type="checkbox"/> Non | <input type="checkbox"/> Oui                               |
| le score zéta   | <input type="checkbox"/> Non | <input type="checkbox"/> Oui                               |
| le score Ez     | <input type="checkbox"/> Non | <input type="checkbox"/> Oui                               |
| Autres          | <input type="checkbox"/> Non | <input type="checkbox"/> Oui <i>Veuillez préciser.....</i> |

### Critères d'évaluation

Numéro de la question	Explication
6	<p>OUI : les laboratoires accrédités sont généralement considérés comme experts ; toutefois, dans ce cas précis, il faut avoir répondu de manière affirmative à la plupart des autres questions pour que cela soit envisagé.</p> <p>NON : la performance du laboratoire peut être évaluée à l'aide des autres questions.</p>
7	<p>OUI : la première étape de l'élaboration d'un protocole de validation spécifique est la rédaction de la procédure générale de validation.</p> <p>NON : si la méthode pour le dosage du mercure (question 9) a été validée, des résultats appropriés pourront être considérés comme acceptables.</p>
8	<p>OUI : la deuxième étape de l'élaboration d'un protocole de validation devrait être la rédaction de la procédure de validation spécifique au mercure. Cela doit représenter l'étape initiale de validation.</p> <p>NON : si la méthode pour le dosage du mercure (question 9) a été validée, des résultats appropriés pourront être considérés comme acceptables.</p>
9	<p>OUI : une méthode validée est indispensable pour évaluer les performances du laboratoire. En outre, si les réponses apportées aux questions de contrôle de la qualité sont appropriées, et que la question 10 rapporte des paramètres statistiques acceptables, la performance du laboratoire sera considérée comme suffisante.</p> <p>NON : Le laboratoire devrait être en mesure de valider la méthode. Il est souhaitable d'avoir des paramètres statistiques pour au moins l'exactitude et la limite de quantification.</p>
10	<p>Ces valeurs permettent d'évaluer la performance d'un laboratoire. La comparaison entre différents laboratoires permet d'évaluer la fiabilité de chacun d'entre eux.</p>
11	<p>Cette question permet de déterminer la performance statistique du laboratoire.</p>

Numéro de la question	Explication
12	Cette question permet de déterminer la performance statistique du laboratoire.
13	Cette question permet de déterminer la performance statistique du laboratoire.
14	Cette question permet de déterminer la performance statistique du laboratoire.
15	Cette question permet de déterminer la performance statistique du laboratoire. Dans ce cas précis, la sous-estimation possible de l'incertitude lors de la mesure doit être évaluée car elle pourrait influencer sur la comparabilité des résultats.
16	<p>OUI : il est nécessaire d'évaluer la portée des contrôles qualité internes afin de veiller à ce que tout écart soit détecté.</p> <p>NON : la première étape pour s'assurer de la fiabilité des résultats doit être d'avoir un système interne de contrôle de la qualité.</p>
17	<p>OUI : il n'est pas nécessaire de mettre en œuvre toutes les procédures de contrôle, mais un nombre de contrôles plus élevé permet d'obtenir de meilleurs résultats.</p> <p>NON : le laboratoire doit essayer de mettre en place au minimum quelques contrôles, par exemple un contrôle de la courbe d'étalonnage et une forme de contrôle des échantillons.</p>
18	<p>OUI : l'utilisation de matériaux de référence certifiés garantit une valeur assignée. Les manipulations éventuelles (dilutions, etc.) doivent être prises en compte afin d'obtenir la valeur finale réelle dans tous les cas.</p> <p>NON : au minimum, il faut utiliser des matériaux de référence (question 19).</p>
19	<p>OUI : le laboratoire peut utiliser des matériaux adaptés si ceux-ci ont été correctement caractérisés.</p> <p>NON : cette question peut être ignorée si la réponse à la question 18 est affirmative.</p>
20	<p>OUI : l'étalonnage du matériel garantit une répétabilité instrumentale et permet d'éviter les erreurs liées à l'équipement.</p> <p>NON : l'étalonnage est la première étape de tout contrôle du matériel. Aucune mesure ne doit être effectuée avant l'étalonnage du matériel essentiel.</p>
21	<p>OUI : un plan ou un programme annuel d'étalonnage du matériel permet de s'assurer que tout le matériel fonctionne correctement. Des vérifications intermédiaires peuvent être effectuées le cas échéant.</p> <p>NON : tout le matériel doit être étalonné avant que l'analyse ne soit menée.</p>
22	<p>OUI : la traçabilité du mesurage est essentielle pour effectuer un contrôle adéquat des conditions environnementales.</p> <p>NON : les données concernant la température, l'humidité et d'autres conditions doivent être suivies lorsque c'est nécessaire. Si ce n'est pas le cas, les résultats finaux ne seront pas considérés comme fiables.</p>
23	<p>OUI : la participation aux programmes annuels de comparaisons interlaboratoires montre la bonne volonté du laboratoire et une réponse affirmative doit être interprétée favorablement.</p> <p>NON : seule une participation à long terme à ces programmes permet au laboratoire de disposer d'un outil efficace pour évaluer ses résultats.</p>

Numéro  
de la  
question

Explication

- 24 Une participation durable à ces programmes doit être évaluée de manière positive, quels qu'en soient les résultats.
- 25 Le score z pourrait ne pas suffire à déterminer les performances du laboratoire. L'emploi de méthodes additionnelles montre que le laboratoire est plus performant.

---

L'évaluation des laboratoires doit s'appuyer sur les informations collectées grâce aux questions 6 à 25 de ce questionnaire. Toutefois, les critères peuvent varier et être appliqués plus ou moins strictement en fonction des exigences et des contextes spécifiques. Compte tenu de cela, les critères suivants peuvent être appliqués.

- Les laboratoires rapportant des réponses négatives aux questions 16 ou 20 doivent être automatiquement exclus.
- Les laboratoires rapportant moins de neuf réponses positives doivent améliorer leur système de qualité, par exemple en mettant en place certaines des activités décrites dans le tableau des critères d'évaluation. En particulier, la validation de la méthode doit être l'objectif final pour tous les participants, et il est fortement recommandé de définir des critères de contrôle de la qualité pour cette validation.
- Pour les laboratoires rapportant moins de 18 réponses positives, il convient de porter une attention particulière aux réponses aux questions 10-15 et 24, qui permettent d'évaluer les performances et permettent au laboratoire d'être considéré comme candidat.
- Le fait d'avoir répondu par l'affirmative à plus de 18 questions indique un bon profil d'analyse de la performance. Le laboratoire peut, par conséquent, être considéré comme candidat pour effectuer l'analyse. Toutefois, il doit participer aux exercices de comparaisons interlaboratoires spécifiques à l'étude de l'OMS.

# Procédure opératoire standardisée pour évaluer le niveau de mercure dans les cheveux humains

(prélèvement, dosage du mercure et interprétation des  
résultats)

## Résumé

Cette procédure opératoire standardisée (POS) décrit le processus d'évaluation de l'exposition prénatale au mercure à l'aide de la biosurveillance humaine, avec des cheveux comme matrice biologique. Le prélèvement de cheveux, le dosage du mercure et l'interprétation des résultats sont décrits dans ce document.

## Mots-clés

Mercure - analyse  
Composés du méthylmercure - analyse  
Biomarqueurs - analyse  
Cheveux - chimie  
Exposition maternelle  
Échange mère-enfant  
Nourrisson, nouveau-né  
Exposition environnementale

## Contributeurs

Argelia Castaño Calvo  
National Centre for Environmental Health, Carlos III Institute of Health (Espagne)  
Marta Esteban López  
National Centre for Environmental Health, Carlos III Institute of Health (Espagne)  
Miguel Angel Lucena  
National Centre for Environmental Health, Carlos III Institute of Health (Espagne)

# Table des matières

<b>Abréviations .....</b>	<b>37</b>
<b>Introduction : les cheveux humains comme matrice pour la biosurveillance humaine du mercure.....</b>	<b>38</b>
<b>1. Prélèvement de cheveux humains .....</b>	<b>39</b>
1.1. Portée de la méthode.....	39
1.2. Précautions nécessaires .....	39
1.3. Matériel requis .....	40
1.4. Préparation/prétraitement du matériel de prélèvement.....	40
1.5. Procédure de prélèvement .....	41
1.6. Étiquetage .....	46
1.7. Transport et conservation de l'échantillon .....	46
1.8. Réception des échantillons .....	46
1.9. Aliquotage/préparation des échantillons.....	47
1.10. Stockage et conservation .....	50
1.11. Contrôle de la qualité.....	50
<b>2. Dosage du mercure dans les cheveux humains .....</b>	<b>51</b>
2.1. Portée de la méthode.....	52
2.2. Principe technique .....	52
2.3. Précautions nécessaires .....	53
2.4. Équipement, matériel et solutions .....	53
2.5. Étalonnage .....	54
2.6. Procédure.....	55
2.7. Contrôle de la qualité.....	58
2.8. Évaluation de la méthode .....	59
<b>3. Interprétation des données .....</b>	<b>62</b>
3.1. Valeurs à interpréter .....	63
<b>Références .....</b>	<b>65</b>
<b>Annexe 1. Registre des échantillons de cheveux collectés.....</b>	<b>68</b>
<b>Annexe 2. Questionnaire sur le prélèvement des cheveux .....</b>	<b>69</b>
<b>Annexe 3. Registre de réception des échantillons .....</b>	<b>70</b>
<b>Annexe 4. Liste de contrôle avant le prélèvement .....</b>	<b>71</b>
<b>Annexe 5. Liste de contrôle après le prélèvement .....</b>	<b>72</b>



# Abréviations

AIEA	Agence internationale de l'énergie atomique
BSH	Biosurveillance humaine
Hg	Mercure
ID	Identification
LDD	Limite de détection
LDQ	Limite de quantification
MRC	Matériaux de référence certifiés

# Introduction : les cheveux humains comme matrice pour la biosurveillance humaine du mercure

Les produits chimiques dans l'environnement qui sont absorbés par le corps peuvent se retrouver dans les cheveux. Les cheveux humains sont largement utilisés dans différents domaines scientifiques, comme la toxicologie judiciaire et clinique, la médecine professionnelle et le contrôle du dopage. Ces dernières années, ils sont aussi utilisés dans le cadre d'études de biosurveillance humaine des produits chimiques dans l'environnement. L'utilisation de cette matrice dans le cadre des études de biosurveillance humaine présente certains avantages comme un prélèvement non invasif et simple, une facilité de transport et de conservation, et aucune exigence de spécificité concernant le matériel ou le personnel pour prélever l'échantillon. Bien que les cheveux ne soient pas une matrice idéale pour de nombreuses études sur les produits chimiques, ils sont particulièrement utiles pour étudier l'exposition au mercure (Hg) liée à la consommation de poisson (1) et un certain nombre d'études menées sur différentes populations ont utilisé des échantillons de cheveux à cette fin (2).

Les cheveux sont généralement le choix idéal pour étudier l'exposition au méthylmercure car l'on peut disposer d'un échantillon simple, intégral et prélevé de manière non invasive. En effet, une fois absorbé par les cheveux, le mercure ne peut pas repasser dans le sang, ce qui fournit un excellent marqueur de l'exposition à long terme au méthylmercure. La plupart du mercure dans les cheveux est présent sous forme de méthylmercure, en particulier au sein des populations qui consomment de grandes quantités de poisson. Les cheveux absorbent le méthylmercure durant leur croissance, et les niveaux observés sont étroitement liés au taux de mercure dans le sang, ce qui fournit une méthode exacte et fiable pour mesurer les niveaux d'absorption de méthylmercure (3).

Le cheveu est une matière biologique qui se développe selon des cycles, alternant entre périodes de croissance et périodes de repos. Il est largement admis que les poils (dont les cheveux) poussent à une vitesse de 1 cm par mois, bien que ce chiffre puisse varier en fonction du type de poils et de l'emplacement sur le corps. En ce qui concerne sa structure, le poil est un réseau croisé, partiellement cristallin et semblable à un polymère contenant différents groupes chimiques fonctionnels qui lient de petites molécules. Il est composé d'environ 65 % à 95 % de protéines, dont une grande partie est riche en soufre. Les poils contiennent également entre 15 % et 35 % d'eau et entre 1 % et 9 % de lipides. Les minéraux représentent moins de 1 % de la composition des poils (4,5).

Cette procédure opératoire standardisée fournit des instructions détaillées pour le prélèvement et l'analyse d'échantillons de cheveux humains et pour l'interprétation des résultats. Les activités de contrôle de la qualité pour les études de biosurveillance humaine du mercure font l'objet de procédures opératoires standardisées distinctes, mais doivent être menées à chaque étape.



# 1. Prélèvement de cheveux humains

Il n'est pas nécessaire de disposer de matériel sophistiqué pour procéder au prélèvement de cheveux et le personnel de terrain sera en mesure de collecter les échantillons après avoir suivi une formation très simple. La procédure décrite évite la survenue de problème esthétique, même dans le cas des cheveux courts, et cela minimise donc le risque de refus de la part des volontaires.

La procédure de prélèvement varie légèrement en fonction de la longueur des cheveux et de la mobilité du volontaire. La méthode décrite couvre ces différentes possibilités.

Une attention particulière doit être accordée à la quantité de cheveux collectés (une quantité trop faible peut compromettre l'analyse) et à l'immobilisation de la mèche.

La quantité d'échantillon dépend de la quantité requise pour procéder à l'analyse chimique. Cela varie en fonction de la méthode d'analyse et de la limite de quantification. Ces thématiques doivent être abordées à l'avance et les quantités définies avec le laboratoire chargé de l'analyse.

L'immobilisation de la mèche est une étape critique lors du prélèvement des cheveux, car il est indispensable de bien identifier les racines au plus près du cuir chevelu. Cette procédure décrit différentes options pour procéder à cette immobilisation. Si l'on utilise du ruban adhésif durant cette étape, il faut porter une attention particulière à la partie de l'échantillon qui va être analysée, laquelle ne doit pas être recouverte de ruban adhésif.

Cette procédure opératoire standardisée propose des points de contrôle durant la réception des échantillons afin de mettre en place des vérifications de routine visant à accepter ou refuser les échantillons.

Des instructions détaillées sont données pour préparer les échantillons de cheveux humains à l'analyse du mercure.

## 1.1. Portée de la méthode

Cette méthode est utilisée pour prélever des échantillons de cheveux humains de différentes longueurs<sup>1</sup> :

- moins de 3,5 cm (1,4")
- 3,5–5 cm (1,4–1,97")
- plus de 5 cm (1,91")

La méthode de préparation et d'aliquotage des échantillons prend également en compte la longueur des échantillons collectés, en fonction de deux situations : les échantillons immobilisés et ceux non immobilisés.

## 1.2. Précautions nécessaires

Pour le prélèvement de cheveux, il convient de prendre les précautions suivantes.

- Il n'y a pas besoin de prendre de précaution spéciale concernant les risques biologiques durant la manipulation des cheveux.
- Lors du prélèvement, il faut utiliser des gants et des ciseaux appropriés.

<sup>1</sup> La longueur prélevée peut varier en fonction du segment de l'échantillon à analyser.

### 1.3. Matériel requis

Le tableau 1 présente le matériel requis pour le prélèvement de cheveux, la raison justifiant cette utilisation et les autres possibilités.

Tableau 1. Matériel pour le prélèvement de cheveux à des fins d'analyse du mercure

Matériel	Raison	Alternative
<b>Alcool et coton</b>	Utilisation à des fins hygiéniques.	
<b>Gants en latex (non poudrés)</b>	Utilisation à des fins hygiéniques.	Gants similaires à utilisation unique non poudrés et jetables composés d'autres matériaux
<b>Ciseaux</b>	Même si l'on peut utiliser différentes méthodes pour récupérer l'échantillon, il est conseillé d'utiliser des ciseaux de coiffure. Étant donné que la mèche doit être coupée très près du cuir chevelu, il est préférable d'utiliser des ciseaux à bouts ronds pour éviter toute blessure.	Toute paire de ciseaux propre et aiguisée de taille appropriée
<b>Étiquettes ID</b>	Les échantillons doivent être clairement identifiés.	Écrire le code ID directement sur l'enveloppe en papier à l'aide d'un marqueur permanent.
<b>Marqueur permanent</b>	Sert à indiquer le côté où se trouvent les racines. Les stylos habituels n'écrivent pas bien sur le ruban adhésif.	Tout autre outil pour écrire permettant de faire une marque qui restera clairement lisible.
<b>Ruban adhésif</b>	Sert à immobiliser la mèche.	Tout autre outil qui permet d'immobiliser la mèche.
<b>Sacs en papier</b>	Ces sacs sont les premiers contenant de l'échantillon. Le papier évite la survenue de tout problème causé par l'électricité statique. La taille doit correspondre à la taille de l'échantillon (par ex., 8x14 cm ; 12x20 cm).	Enveloppes en papier
<b>Sachets en plastique refermables</b>	Ce deuxième contenant protège l'échantillon des liquides. La taille doit correspondre à la taille de l'échantillon (par ex., 8x14 cm ; 12x20 cm).	Tout autre type de sac plastique qui garantit l'isolation de l'échantillon.

ID = identité. Remarque : une liste de contrôle avant le prélèvement est disponible à l'annexe 4.

### 1.4. Préparation/prétraitement du matériel de prélèvement

Le matériel de prélèvement pour collecter des cheveux n'a pas besoin de préparation ou de prétraitement spécifique. Cependant, pour des raisons d'hygiène, les ciseaux doivent être nettoyés avant chaque prélèvement d'échantillon. Tout le matériel pour le prélèvement de cheveux doit être prêt et à la disposition de l'argent de terrain chargé d'effectuer le prélèvement.

La procédure de nettoyage des ciseaux est la suivante.

1. Enfiler une paire de gants jetables à usage unique.
2. Humidifier un carré de coton avec de l'alcool.
3. Nettoyer les ciseaux avec le carré humidifié (photo 1).



Photo 1. Nettoyage des ciseaux.  
© Instituto de Salud Carlos III

## 1.5. Procédure de prélèvement

La procédure à suivre pour prélever un échantillon de cheveux varie quelque peu en fonction de leur longueur. Cette variable déterminera également la manière d'immobiliser la mèche. Veuillez noter que ce document a été élaboré en partant du principe que l'analyse portera sur les 3 cm de cheveux les plus proches de la racine. Si l'analyse est effectuée sur un échantillon d'une longueur différente, il faut veiller à ne pas poser de ruban adhésif sur la portion à analyser.

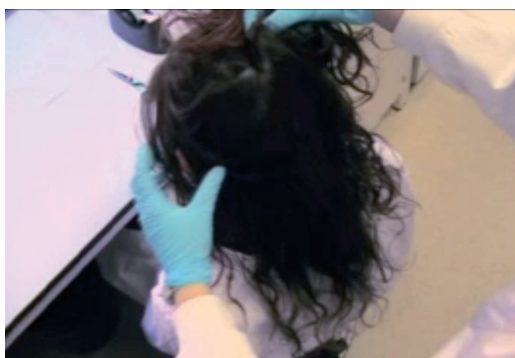
Le matériel requis pour procéder à un prélèvement de cheveux doit être prêt et à la disposition de la personne ou de l'équipe chargée de procéder à ce prélèvement.

Les échantillons doivent être prélevés sur la même zone du crâne chez tous les volontaires. Si les cheveux sont longs, deux mèches de cheveux doivent être prélevées, une de chaque côté de la tête. Par souci esthétique, sur les cheveux courts, il faut prélever de petites mèches de cheveux à différents endroits mais sur la même zone du crâne.<sup>2</sup>

### 1.5.1. Chevelure mesurant plus de 5 cm (1,97")

Le protocole pour prélever des cheveux mesurant plus de 5 cm (1,97") est décrit ci-dessous.

1. Attraper les cheveux situés au milieu sur l'arrière de la tête et les soulever vers le haut du crâne (photos 2a et b).



Photos 2a et b. Attraper les cheveux ; a) en position assise, b) en position allongée. © Instituto de Salud Carlos III

<sup>2</sup> Une vidéo montrant la procédure de prélèvement est disponible sur la page Web du *Centro Nacional de Sanidad Ambiental, Instituto de Salud Carlos III* (6).

2. Prendre une mèche de cheveux à l'horizontale et l'enrouler sur elle-même (photos 3a et b).



Photos 3a et b. Enrouler la mèche sur elle-même ; a) en position assise, b) en position allongée. © Instituto de Salud Carlos III

3. Attacher la mèche avec du ruban adhésif à 5-6 cm (1,97-2,36") des racines (photos 4a et b). L'analyse est effectuée sur les 3 cm les plus proches des racines ; il faut donc s'assurer que ce segment ne comporte pas de ruban adhésif.

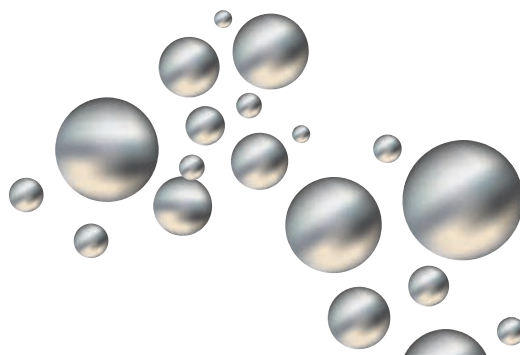


Photos 4a et b. Attacher la mèche avec du ruban adhésif ; a) en position assise, b) en position allongée. © Instituto de Salud Carlos III

4. Avec les ciseaux, couper la mèche aussi que près que possible du cuir chevelu (photos 5a et b).

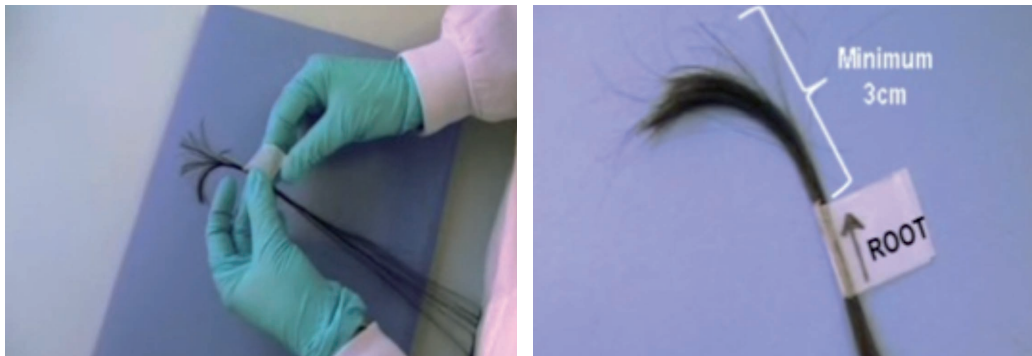


Photos 5a et b. Couper l'échantillon près du cuir chevelu ; a) en position assise, b) en position allongée. © Instituto de Salud Carlos III





5. Refermer le bout de ruban adhésif et indiquer par une flèche le côté où se trouvent les racines (photos 6a et b).



Photos 6a et b. Refermer le bout de ruban adhésif a) et indiquer par une flèche le côté où se trouvent les racines b). © Instituto de Salud Carlos III

**Remarque.** La distance minimale entre le ruban adhésif et la racine des cheveux dépend de l'échantillon à analyser (dans ce cas-ci, les 3 premiers centimètres). Cette portion ne doit pas comporter de ruban adhésif.

6. Placer l'échantillon de cheveux dans une enveloppe en papier et indiquer le code identité (ID) de l'échantillon (photo 7).



Photo 7. Placer les cheveux dans une enveloppe en papier.  
© Instituto de Salud Carlos III

7. Répéter l'opération avec une deuxième mèche provenant de l'autre côté du crâne, à l'arrière également.
8. Placer l'enveloppe en papier dans le sachet en plastique refermable (photo 8).



Photo 8. Placer l'enveloppe dans un sachet refermable.  
© Instituto de Salud Carlos III

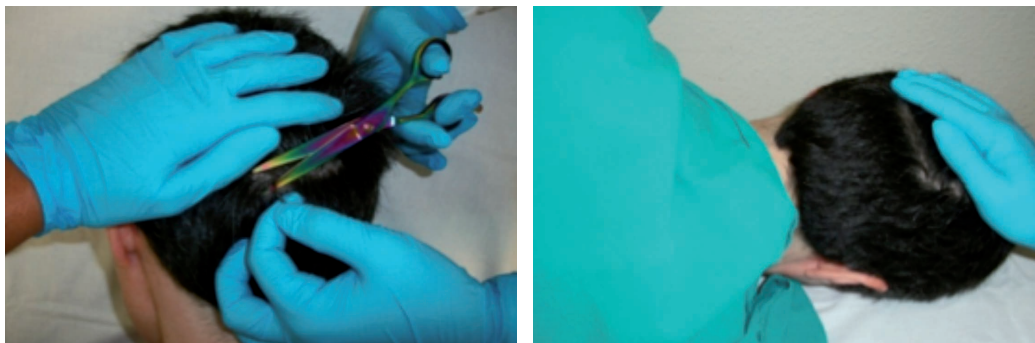
**Remarque.** Pour avoir la certitude d'avoir prélevé la quantité minimale d'échantillon, les mèches devraient comporter au moins 250 cheveux. Toutefois, le poids de l'échantillon peut varier en fonction du type de cheveux et de la longueur. La quantité minimum nécessaire pour effectuer les analyses doit être vérifiée auprès du laboratoire qui analysera l'échantillon.

### 1.5.2. Chevelure mesurant moins de 3,5 cm (1,4")

Les échantillons de cheveux mesurant moins de 3,5 cm ne doivent pas être immobilisés avec du ruban adhésif, afin de veiller à ce que l'échantillon n'en comporte pas.

La procédure de prélèvement de cheveux de cette longueur est la suivante.

1. Couper 5-10 mèches de cheveux sur différentes zones de l'arrière du crâne (photos 9a et b).



Photos 9a et b. Couper les mèches de cheveux ; a) en position assise, b) en position allongée. © Instituto de Salud Carlos III

2. Placer les cheveux directement dans l'enveloppe en papier.
3. Répéter l'opération jusqu'à ce qu'une quantité suffisante de cheveux ait été prélevée et indiquer sur l'enveloppe le code ID de l'échantillon (photos 10a et b).

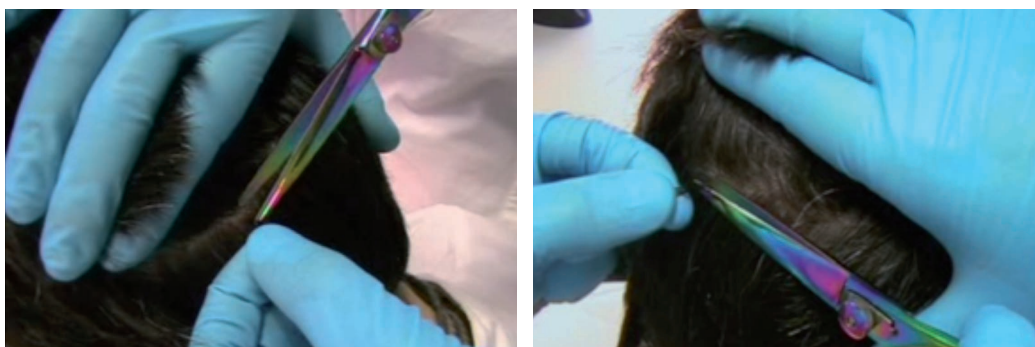


Photo 10a et b. Répéter le prélèvement de mèches de cheveux ; a) en position assise, b) en position allongée. © Instituto de Salud Carlos III

4. Placer l'enveloppe en papier dans le sachet en plastique refermable (photo 8).

**Remarque.** Afin de garantir qu'une quantité suffisante ait été prélevée, le personnel de terrain prélevant les échantillons devrait disposer d'un exemple d'échantillon de cheveux ou d'une photo fournie par le coordinateur de l'étude à l'échelle nationale ou par le laboratoire responsable ; voir l'exemple ci-dessous.

Cette quantité est suffisante pour effectuer une analyse directe du mercure par décomposition thermique, amalgamation et spectrométrie d'absorption atomique (photo 11). En fonction de la technique d'analyse, la quantité minimale nécessaire peut varier et elle doit donc être approuvée par le laboratoire qui analyse l'échantillon.



Photo 11. Un échantillon de cheveux en quantité suffisante.  
© Instituto de Salud Carlos III



### 1.5.3. Chevelure mesurant entre 3,5 et 5 cm (1,4 et 1,97")

Pour les cheveux de cette longueur, la technique d'immobilisation de la mèche est déterminée par la nécessité d'empêcher le ruban adhésif d'entrer en contact avec les 3 centimètres les plus proches des racines. Cette exigence varie en fonction de la mèche de cheveux à analyser.

La procédure de prélèvement de cheveux de cette longueur est la suivante.

1. Couper une mèche de cheveux aussi près des racines que possible, en suivant les instructions pour le prélèvement de cheveux mesurant plus de 5 cm.
2. En attachant la mèche, veiller à ce que les 3 cm les plus proches des racines soient disponibles pour être analysés. Plusieurs options sont possibles, dont trois sont décrites ci-dessous.

#### *Première option*

- a. Couper un bout de ruban adhésif.
- b. Placer le ruban adhésif sur la mèche (veiller à ce que les 3 centimètres les plus proches du crâne n'entrent pas en contact avec le ruban adhésif) (photo 12).



Photo 12. Placer le ruban adhésif sur la mèche.  
© Instituto de Salud Carlos III

- c. Placer un autre bout de ruban adhésif par-dessus le premier.

#### *Deuxième option*

- a. Immobiliser le bout de la mèche (côté racines) à l'aide d'un pince-notes et d'une feuille de papier (photo 13).

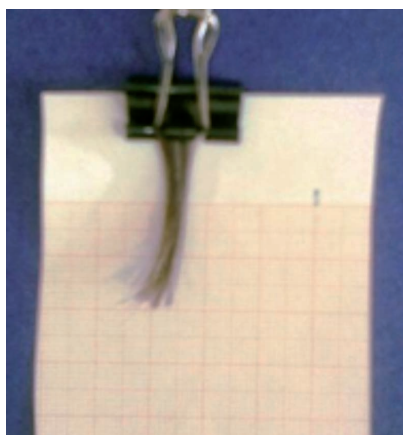


Photo 13. Immobiliser la mèche à l'aide d'un pince-notes.  
© Instituto de Salud Carlos III

- b. Placer l'échantillon de cheveux dans une enveloppe en papier et indiquer le code ID de l'échantillon.
- c. Répéter l'opération avec une deuxième mèche provenant de l'autre côté du crâne, à l'arrière également.
- d. Placer l'enveloppe en papier dans le sachet en plastique refermable.

### Troisième option

- a. Agrafer la mèche de cheveux le plus serré possible (photo 14).
- b. Vérifier que la mèche est complètement immobilisée.



Photo 14. Agrafer l'échantillon de cheveux.  
© Instituto de Salud Carlos III

## 1.6. Étiquetage

L'échantillon de cheveux doit être étiqueté avec le code ID et la date de prélèvement immédiatement après la collecte. Il est nécessaire de disposer de ces deux informations au cas où l'une d'entre elles serait erronée. L'étiquette devrait figurer sur le premier contenant (enveloppe en papier), et si l'on ne dispose d'aucune étiquette, le code peut être écrit dessus directement.

## 1.7. Transport et conservation de l'échantillon

Les échantillons de cheveux n'ont pas besoin de conditions de transport spéciales ; ils peuvent être transportés à température ambiante. Toutefois, il faut vérifier que les documents correspondants accompagnent bien les échantillons, notamment une feuille répertoriant tous les échantillons et les informations concernant tout événement qui se serait produit pendant le prélèvement et qui pourrait avoir des répercussions sur les échantillons (cf. Annexe 1).

## 1.8. Réception des échantillons

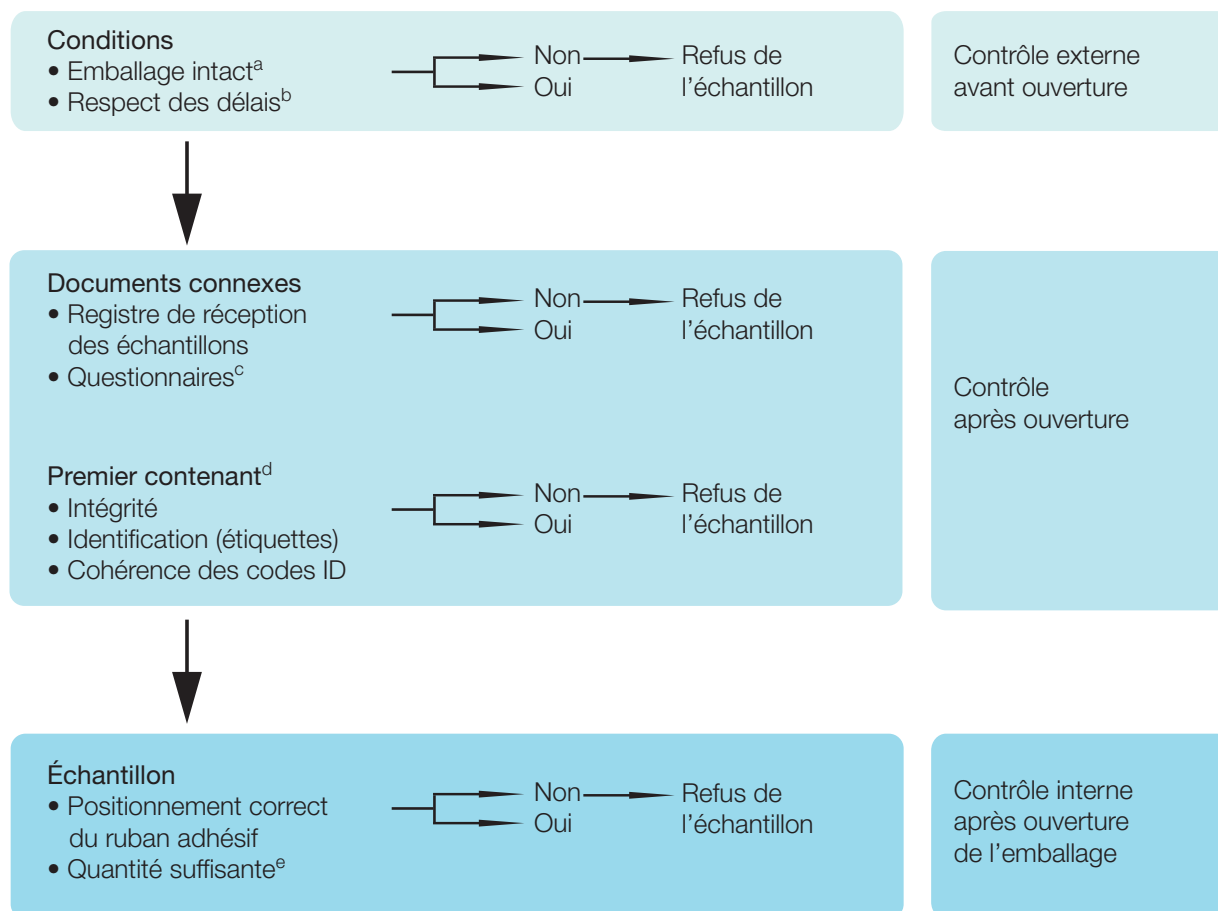
Les critères d'acceptation ou de rejet d'un échantillon doivent être définis à l'avance et appliqués durant la phase de réception de l'échantillon. Ces critères doivent porter sur les conditions de transport, les pièces justificatives, l'intégrité de l'emballage, la validité de l'identification et la quantité de l'échantillon (suffisante pour mener une analyse et effectuer une mise en banque si les échantillons sont conservés et utilisés pour mener d'autres études).

Les points suivants doivent être contrôlés au moment de la réception des échantillons de cheveux.

- Intégrité de l'emballage : les lots doivent être correctement fermés et ne pas avoir été manipulés ; un scellé de sécurité peut être posé sur l'emballage sur le site de prélèvement.
- Les documents connexes : tous les échantillons répertoriés dans le registre des échantillons prélevés (cf. Annexe 1) doivent figurer dans l'emballage ; ils doivent être accompagnés des documents correspondants (questionnaires, etc.).
- Validité de l'identification : les échantillons et les documents reçus doivent être correctement identifiés avec les codes ID correspondants (cf. Annexe 2).
- Quantité et qualité des échantillons : les échantillons doivent avoir été prélevés correctement (vérifier le positionnement du ruban adhésif et la quantité de cheveux prélevés).

Afin de suivre un protocole unique et d'appliquer les mêmes critères pour tous les échantillons reçus, il est possible de suivre le plan illustré à la figure 1.

Figure 1. Plan de réception des échantillons



<sup>a</sup> Les lots doivent être correctement fermés et ne pas avoir été manipulés

<sup>b</sup> Le délai maximal entre le prélèvement des échantillons et leur arrivée au laboratoire doit être défini à l'avance.

<sup>c</sup> Si une ou plusieurs questions figurant dans les questionnaires sont cruciales pour l'interprétation des résultats ou représentent un critère d'acceptation ou de refus, elles doivent être vérifiées.

<sup>d</sup> L'état du sachet en plastique refermable doit être contrôlé. Tous les échantillons doivent être correctement identifiés et il faut vérifier qu'il y ait une cohérence entre les codes ID des échantillons et les questionnaires.

<sup>e</sup> La quantité d'échantillon prélevée est un point essentiel. Si la quantité prélevée est insuffisante pour effectuer l'analyse chimique, l'échantillon doit être refusé.

Un exemple de registre de réception des échantillons figure à l'annexe 3 et les listes de contrôle avant et après le prélèvement sont incluses dans les annexes 4 et 5.

## 1.9. Aliquotage/préparation des échantillons

Tous les échantillons acceptés doivent être préparés pour l'analyse et conservés dans des contenants en polypropylène fermés hermétiquement afin d'éviter toute détérioration de l'analyte cible et de la matrice. Le matériel à utiliser durant cette phase est répertorié dans le tableau 2.

Dans le laboratoire, il convient de n'utiliser que des identifiants numériques afin de préserver la confidentialité. Une identification sans équivoque des spécimens est nécessaire pour relier les résultats du laboratoire aux informations d'ordre démographique ou nutritionnel ou aux renseignements sur le mode de vie qui sont également collectés pour les besoins de l'étude.

Tableau 2. Matériel pour l'aliquotage/la préparation des échantillons de cheveux

Matériel	Raison	Alternative
<b>Éthanol à 70 %</b>	Pour nettoyer la pince brucelles et les ciseaux après chaque échantillon.	
<b>Gants en latex (non poudrés)</b>	Utilisation à des fins hygiéniques.	Gants similaires à utilisation unique non poudrés et jetables composés d'autres matériaux.
<b>Papier millimétré</b>	La portion de l'échantillon à analyser doit être coupée du reste de la mèche.	Règle.
<b>Pince brucelles de laboratoire</b>	Pour la manipulation de l'échantillon.	Tout autre outil qui permet une manipulation correcte de l'échantillon.
<b>Ciseaux</b>	L'échantillon de cheveux à analyser doit être découpé en petites portions.	Toute paire de ciseaux propre et aiguisée de taille appropriée.
<b>Pince-notes</b>	Sert à immobiliser la mèche.	Tout autre objet qui permet une immobilisation correcte de la mèche.
<b>Flacon en polypropylène</b>	Pour conserver les échantillons de cheveux.	Tout autre contenant qui peut préserver l'échantillon de l'humidité.
<b>Étiquettes</b>	Les échantillons doivent être clairement identifiés.	Écrire le code ID avec un marqueur permanent.

ID = identité.

### 1.9.1. Échantillons de cheveux longs immobilisés

Les échantillons de cheveux immobilisés (ceux mesurant plus de 5 cm [1,97"] et ceux mesurant entre 3,5 et 5 cm [1,4 et 1,97"]) doivent être préparés de la manière suivante.

1. Retirer la mèche de cheveux du sac dans lequel l'échantillon a été transporté à l'aide d'une pince brucelles.
2. Placer la mèche sur une feuille de papier millimétré recouvrant la surface de travail et l'immobiliser avec le pince-notes du côté opposé à celui des racines (photo 15). Le papier millimétré doit être changé après chaque échantillon.

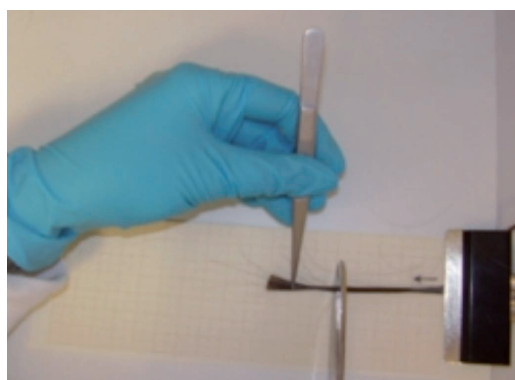


Photo 15. Immobiliser la mèche à l'aide d'un pince-notes.  
© Instituto de Salud Carlos III

3. Couper les 3 centimètres (ou la longueur à analyser définie) les plus proches des racines à l'aide de la pince brucelles.
4. Placer les cheveux découpés dans le flacon sur lequel figure le code de l'échantillon. Le bouchon doit être étiqueté avec le même code. Les cheveux restants doivent être jetés avec les déchets conventionnels.
5. Découper les cheveux en tout petits morceaux à l'aide des ciseaux (photo 16).

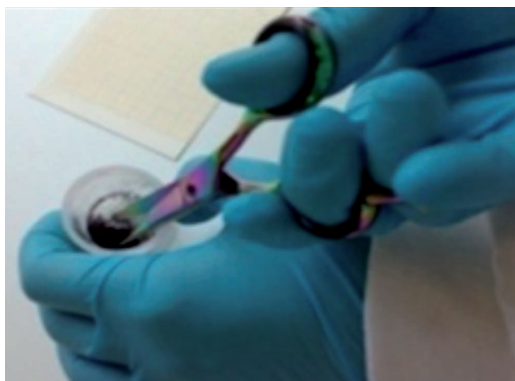


Photo 16. Découper les cheveux en tout petits morceaux.  
© Instituto de Salud Carlos III

6. Vérifier que l'échantillon final est bien homogène (photos 17a et b).



Photos 17a et b. Vérifier que l'échantillon est homogène.

7. Suivre le même protocole pour les autres échantillons.
8. Nettoyer la pince brucelles et les ciseaux avec de l'éthanol à 70 % après chaque échantillon.
9. Pour préparer les aliquotes de cheveux, peser la quantité requise pour le laboratoire dans un flacon en polypropylène et l'étiqueter avec le code ID de l'échantillon.

### 1.9.2. Échantillons de cheveux courts non immobilisés

La procédure à suivre pour préparer les échantillons de cheveux qui n'ont pas été immobilisés (par ex., les cheveux mesurant moins de 3,5 cm [1,4"]) est la suivante.

1. Placer l'échantillon de cheveux directement dans le flacon à l'aide de la pince brucelles. Le même code doit figurer sur le flacon et le bouchon.
2. Découper les cheveux en tout petits morceaux à l'aide des ciseaux.
3. Vérifier que l'échantillon final est bien homogène.
4. Nettoyer la pince brucelles et les ciseaux avec de l'éthanol à 70 % après chaque échantillon.
5. Pour préparer les aliquotes de cheveux, peser la quantité requise pour le laboratoire dans un flacon en polypropylène et l'étiqueter avec le code ID de l'échantillon.

## 1.10. Stockage et conservation

Les échantillons devant être stockés pendant plus d'un mois doivent être congelés. L'urine (même fraîche) contient des sels inorganiques pouvant produire des précipités. Il est donc nécessaire d'homogénéiser les échantillons en les agitant avant l'analyse. Il est également possible d'améliorer la solubilité des sels en ajoutant une petite quantité d'acide chlorhydrique, afin de réduire le pH de l'urine. On fera en sorte d'empêcher la prolifération des micro-organismes, car ils risqueraient d'entraîner la gazéification et la volatilisation du mercure inorganique. On estime à moins de 10 ng/ml la concentration moyenne de mercure présente dans l'urine de la population générale vivant dans une région sans exposition particulière à ce métal. Il est prouvé que le mercure reste stable pendant un an à -20°C.

Les échantillons d'urine sont généralement transportés et stockés à -20°C. Il est nécessaire d'établir des procédures de stockage, de façon à contrôler l'emplacement des échantillons, le nombre d'aliqots restants, etc. Les échantillons réceptionnés doivent être congelés à -20°C jusqu'à leur analyse. Après le prélèvement des aliqots destinés à l'analyse, le reste des échantillons doit être recongelé à -20 °C. La décongélation et la recongélation répétées ne compromettent pas la stabilité des échantillons, même ceux contenant des conservateurs.

## 1.11. Contrôle de la qualité

### 1.11.1. Documents connexes

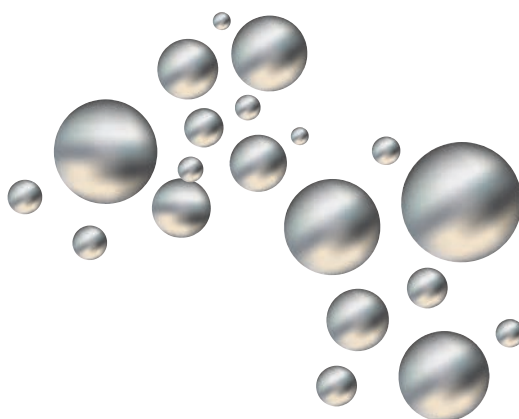
Il est essentiel d'assurer la traçabilité de l'échantillon tout au long de l'étude, donc celle-ci doit être garantie. Comme indiqué précédemment, il est essentiel d'étiqueter correctement les échantillons et les documents connexes, mais il est aussi nécessaire de pouvoir relier l'échantillon aux informations fournies par le volontaire. À cette fin, tous les documents concernant les échantillons (questionnaires, registres, etc.) doivent être étiquetés avec le code ID de l'échantillon immédiatement après création.

### 1.11.2. Listes de contrôle

Le personnel de terrain doit vérifier chaque étape du prélèvement afin d'obtenir des échantillons de bonne qualité. Les listes de contrôle représentent des outils utiles à cette fin ; elles doivent être élaborées avec le personnel de terrain et être adaptées à chaque contexte.

Les points de contrôle suivants doivent être envisagés.

- Avant le prélèvement : vérifier que tout le matériel nécessaire pour le prélèvement est prêt à être utilisé, ainsi que tous les documents connexes (voir exemple d'une liste de contrôle avant le prélèvement à l'annexe 4).
- Après le prélèvement : vérifier que tous les échantillons sont bien accompagnés des documents correspondants dans l'emballage de transport. Cette vérification doit inclure un contrôle de la cohérence entre les codes d'identification figurant sur les documents et ceux des échantillons. Le personnel de terrain doit vérifier que les questionnaires et les registres soient correctement remplis (voir exemple d'une liste de contrôle après le prélèvement à l'annexe 5).





## 2. Dosage du mercure dans les cheveux humains

Il est possible de recourir à de nombreuses méthodes d'analyse pour analyser le taux total de mercure dans les cheveux humains, les plus utilisées étant la spectrométrie d'absorption atomique de vapeur froide (SAAVF) et la spectrométrie de fluorescence atomique de vapeur froide (SFAVF). Certaines méthodes, comme l'analyse par activation neutronique ou l'analyse par fluorescence X, permettent d'effectuer une analyse des cheveux par segments. D'autres méthodes employées pour l'analyse du mercure dans les cheveux sont la spectrométrie d'émission optique par plasma à couplage inductif (ICP-OES), la spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif (ICP-AES), la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS), la spectrométrie d'absorption atomique par four graphite (GFAAS) et l'émission de rayons X induite par particules (analyse PIXE). La plupart de ces méthodes nécessitent la digestion des échantillons avant analyse, ce qui augmente les risques de contamination ou de perte. À l'inverse, les techniques d'introduction directe de solides, qui ne requièrent aucun traitement préalable des échantillons, génèrent très peu de déchets chimiques et entraînent des risques de contamination bien moindres. En outre, la quantité de cheveux requise pour procéder à l'analyse peut être réduite, ce qui augmente le rendement de l'échantillon. Ces avantages font de l'analyse directe par spectrométrie d'absorption atomique une méthode très utile pour l'analyse des cheveux dans le cadre des études de biosurveillance humaine (7). Cette technique combine la combustion, l'amalgame or/mercure et la détection par spectrométrie d'absorption atomique, et ne requiert qu'une préparation minimale de l'échantillon (8).

Le lavage des échantillons de cheveux est un sujet controversé, mais le recours à cette technique est justifié par le dépôt possible du mercure présent dans l'atmosphère. La procédure idéale de lavage ne doit retirer que le mercure externe, en épargnant la contamination endogène. L'inclusion d'une étape de lavage dans le protocole d'analyse des cheveux implique une manipulation supplémentaire de l'échantillon, et donc la possibilité d'une perte de mercure ou d'une contamination.

Différentes méthodes de lavage à l'aide d'une variété de solvants ont été testées et il a été démontré que certaines pouvaient retirer le mercure endogène (9-11). Il convient d'étudier s'il est opportun de laver les échantillons dans certains points sensibles où la principale source d'exposition au mercure n'est pas la consommation de poisson, par exemple les points où vivent des populations exposées à des activités d'extraction artisanale de l'or, près de sites industriels (génération d'électricité et de chaleur par combustion du charbon, usines de chlore-alcali, etc.) ou de sites accueillant des déchets mercuriels (12). De plus, des questions spécifiques pour évaluer cette exposition potentielle devraient être incluses dans le questionnaire.

La méthode décrite dans cette procédure opératoire standardisée permet de déterminer de manière fiable et précise le dosage du mercure contenu dans les échantillons de cheveux pour les concentrations typiques entraînées par une exposition environnementale et professionnelle.

Comme elle ne requiert aucun traitement préalable et aucune extraction, elle génère normalement très peu de déchets chimiques et les risques de contamination sont minimales. La petite quantité d'échantillon de cheveux nécessaire et les délais d'analyse rapides permettent un rendement élevé de l'échantillon.

Même si l'on recommande un échantillon de 3,0 mg-6,0 mg pour cette procédure, le laboratoire peut fixer sa propre valeur en prenant en compte le matériel utilisé, le développement et la validation de la méthode et les valeurs attendues de ses échantillons.

Le laboratoire doit accorder une attention particulière à la quantité de cheveux reçue, car une quantité trop faible peut compromettre l'analyse. Par conséquent, il est fortement recommandé de demander une quantité minimale de 300 mg de cheveux.

La limite de quantification pour les méthodes décrites doit être au moins de 0,01 nanogramme de mercure par milligramme de cheveux, afin d'éviter tout problème de quantification du mercure dans les populations peu exposées à ce contaminant.

La limite de quantification d'un nanogramme de mercure a été établie en fonction de la configuration décrite dans ce document, avec les deux cellules de mesure. Le poids maximal de l'échantillon avec la configuration de matériel décrite dans les procédures opératoires standardisées étant de 100 mg, une limite de quantification de 0,01 ng/mg peut être atteinte. Des limites de détection plus faibles peuvent être atteintes, si nécessaire, en utilisant des instruments avec une troisième cellule de mesure.

Une attention particulière doit être accordée au taux de récupération pour les niveaux les plus faibles, étant donné que les taux de récupération acceptables se situent toujours au-dessus de 80 %.

Le niveau le plus élevé pour la courbe d'étalonnage inclus dans cette méthode est de 25 ng de mercure ; ces niveaux peuvent toutefois être modifiés par le laboratoire durant la procédure de validation.

Même si l'analyseur de mercure peut détecter des niveaux allant jusqu'à 1000 ng de mercure, il n'est pas nécessaire d'avoir des niveaux de cet ordre de grandeur pour déterminer la présence de cet élément dans les échantillons de cheveux, par conséquent ils n'ont pas été pris en compte ici.

La linéarité, la précision, l'exactitude et l'incertitude ont été déterminées pour chaque niveau de la courbe d'étalonnage. Chaque laboratoire doit établir ses propres niveaux pour la validation de la méthode, même si au moins une concentration proche de la limite de quantification doit être incluse.

Dans le cas où le laboratoire utilise d'autres équipements pour la détection du mercure au sein d'échantillons traités par digestion acide, il est conseillé de suivre les instructions fournies par le fabricant du matériel. Les instructions relatives au prélèvement et à la manipulation des échantillons fournies dans cette procédure opératoire standardisée sont adaptées quel que soit le matériel utilisé pour la détection du mercure. Il faut vérifier que les limites de détection et de quantification soient adaptées pour les échantillons de cheveux.

## 2.1. Portée de la méthode

La méthode décrite dans cette procédure permet une quantification rapide et exacte du mercure contenu dans les cheveux humains. La fourchette pour cet essai est de 1 ng-25 ng de mercure au total.

## 2.2. Principe technique

Dans cette procédure opératoire standardisée, le mercure dans les cheveux est quantifié par décomposition thermique, amalgamation d'or et spectrométrie d'absorption atomique, une technique d'analyse très sensible et sélective qui convient parfaitement aux analyses des éléments à l'état de traces. Cette technique est couramment utilisée dans les études de biosurveillance humaine des expositions à long terme pour la détection de très faibles concentrations de mercure dans les échantillons humains prélevés de manière non invasive.

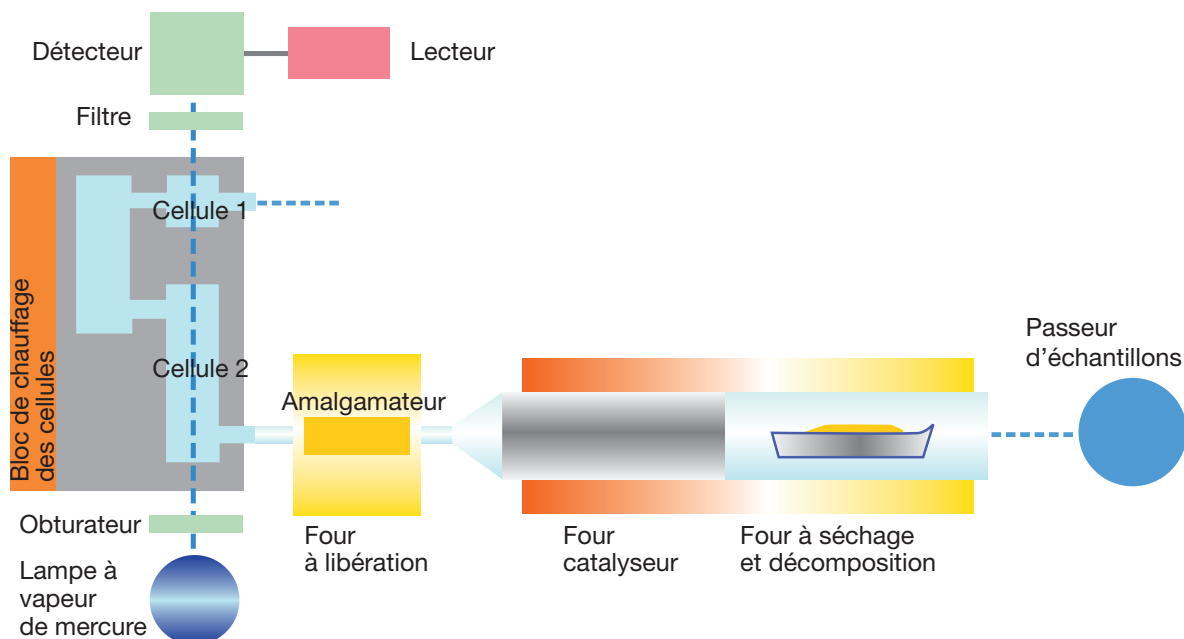
Les échantillons de cheveux sont pesés et introduits dans la nacelle sans aucun traitement préalable. L'échantillon est ensuite introduit dans l'analyseur de mercure direct (cf. Figure 2), où il est d'abord séché puis décomposé thermiquement avec un flux continu d'oxygène. Les produits de combustion sont transportés puis décomposés à nouveau au-dessus d'un catalyseur chaud. Les vapeurs de mercure sont emprisonnées dans un amalgamateur d'or et ensuite désorbées pour la quantification. Le taux de mercure est déterminé par spectrométrie d'absorption atomique à 254 nm.

La détermination quantitative du mercure est possible grâce à une courbe d'étalonnage obtenue à partir de matériaux de référence composés de cheveux humains analysés de la même manière que les échantillons de cheveux.

L'analyseur de mercure direct peut être configuré de différentes manières en fonction du type de modèle utilisé. Pour la procédure décrite ici, l'on a utilisé une version standard équipée de deux cellules de mesure de différentes longueurs de circuit. Les valeurs de référence pour les plages de fonctionnement des deux cellules de mesure sont de 0-20 ng de mercure (fourchette inférieure) et de 20 ng-1000 ng de mercure (fourchette supérieure).



Figure 2. Analyseur de mercure direct



Hg = mercure.

*Remarque* : la version standard du Milestone DMA-80 (illustré ici) est équipée de deux cellules de mesure, d'une lampe de mercure et d'un détecteur de mercure.

*Source* : Milestone (13).

## 2.3. Précautions nécessaires

Il convient de prendre les précautions suivantes lors de l'analyse du dosage du mercure dans les cheveux humains.

- Il n'y a pas besoin de prendre de précaution spéciale concernant les risques biologiques durant la manipulation des cheveux.
- Porter des gants, une blouse de laboratoire et des lunettes de protection pour manipuler toutes les solutions.
- Il convient de faire très attention à l'acide chlorhydrique concentré car c'est un produit chimique très dangereux pour les yeux et la peau.
- Les dangers possibles liés à l'utilisation du matériel sont l'exposition à des rayonnements ultraviolets, à des tensions élevées et à de fortes températures.

## 2.4. Équipement, matériel et solutions

### 2.4.1. Équipement

L'analyse du dosage du mercure dans les cheveux humains nécessite l'équipement suivant :

- analyseur de mercure direct (par ex. Milestone DMA-80).

### 2.4.2. Matériel

Le dosage du mercure dans les cheveux humains nécessite le matériel suivant :

- balance de précision (lecture : 0,01 mg)
- micropipette, réglable entre 100 µl et 1000 µl
- ciseaux

- spatule
- nacelles en nickel, 0,5 ml
- nacelles en quartz, 1,5 ml
- pinces antistatiques
- convoyeur de bacs d'échantillons
- fiole jaugée de 100 ml
- gants sans talc

### 2.4.3. Réactifs, produits chimiques et gaz

Le dosage du mercure dans les cheveux humains nécessite les réactifs, les produits chimiques et les gaz suivants :

- oxygène gazeux (pur à 99,995 %)
- éthanol à 70 % (pour analyse)
- acide chlorhydrique à 37 % (pour analyse)
- eau purifiée (eau bidistillée)

### 2.4.4. Solutions

L'analyse du dosage du mercure dans les cheveux humains nécessite la solution suivante :

- acide chlorhydrique à 0,37 % (pipette de 1 ml d'acide hydrochlorique à 37 % dans une fiole jaugée de 100 ml puis remplir jusqu'au volume nominal avec de l'eau ultrapure).

### 2.4.5. Références d'étalonnage

Deux matériaux de référence composés de cheveux contenant différents niveaux de mercure sont utilisés. Les références utilisées dans cette procédure opératoire standardisée sont les suivantes :

- NIES MRC No.13 (NIES-13) :  $4,42 \pm 0,20$  ng/mg
- Matériau de référence AIEA-086 :  $0,573$  ( $0,534-0,612$ ) ng/mg.

## 2.5. Étalonnage

L'étalonnage se fait à l'aide des matériaux de référence pour les cheveux humains NIES-13 et AIEA-086 pour l'intervalle 1-25 ng de mercure.

Le tableau 3 contient une liste des poids approximatifs des matériaux de référence qui doivent être pesés en triplicat pour chaque point d'étalonnage.

Les références d'étalonnage sont ensuite mesurées dans les mêmes conditions que les échantillons. Les paramètres de l'équation du second degré et le coefficient de corrélation  $r^2$  sont calculés à partir du graphique d'étalonnage obtenu. Ces paramètres doivent s'inscrire dans les intervalles établis lors de la validation de la méthode.

La fréquence de l'étalonnage doit être décidée par chaque laboratoire. À titre indicatif, un nouvel étalonnage doit avoir lieu tous les trois mois. Un nouvel étalonnage doit également avoir lieu si les valeurs des échantillons de contrôle de la qualité ne s'inscrivent pas dans l'intervalle établi.

Tableau 3. Poids des matériaux de référence

Hg (ng)	Norme de référence	Poids (mg)
0		0,00
1	AIEA 086	1,75
2,5	AIEA 086	4,36
5	AIEA 086	8,73
10	NIES 13	2,26
15	NIES 13	3,39
20	NIES 13	4,53
25	NIES 13	5,66

Hg = mercure ; AIEA = Agence internationale de l'énergie atomique ; NIES = National Institute for Environmental Studies.

## 2.6. Procédure

### 2.6.1. Préparation de l'équipement pour l'analyse

#### Données techniques

Les données techniques du matériel d'analyse sont les suivantes :

- principe : spectrométrie d'absorption atomique ;
- système de détection du mercure : spectrophotomètre à un faisceau avec flux séquentiel par deux cellules de mesure ;
- source de lumière : lampe à vapeur de mercure à basse pression ;
- longueur d'onde : 253,65 nm ;
- filtre interférentiel : 254 nm, bande passante de 9 nm ;
- détecteur : photodétecteur d'ultraviolets en silicone ;
- échantillonneur automatique : intégré, 40 positions ;
- gaz vecteur : oxygène, admission du gaz 4 bar (60 psi), débit d'environ 200 ml/min.

Les données techniques décrites ci-dessus ont été établies pendant la configuration de l'instrument utilisé pour cette analyse.

#### Étape 1. Préparation de l'analyseur de mercure direct

Les manipulations suivantes doivent être réalisées selon les instructions du manuel de l'utilisateur : ouverture de l'alimentation en oxygène, démarrage de l'analyseur de mercure direct et création d'un fichier de données.

## Étape 2. Nettoyage du système

Mesurer un emplacement vide en suivant une méthode appropriée. Les conditions de mesures décrites ici ont été établies en fonction de la configuration de l'instrument utilisé dans ce cas précis et doivent être optimisées pour les autres instruments en suivant les instructions du fabricant :

- temps de séchage : 10 s
- température de séchage : 200°C
- temps de décomposition : 240 s
- température de décomposition : 650°C
- temps de purge : 60 s

Cette étape doit être répétée jusqu'à obtention consécutive de deux valeurs d'absorption inférieures à 0,003. Si le niveau de fond souhaité n'est pas atteint, l'analyseur de mercure direct doit être nettoyé en analysant une solution d'acide chlorhydrique (0,37 %) dans une nacelle à combustion en quartz, puis l'étape de nettoyage du système doit être répétée.

## Étape 3. Vérification du système de fond

Trois nacelles à combustion vides en nickel doivent être analysées à l'aide de la méthode précédente. Les valeurs d'absorption obtenues doivent être inférieures à 0,003, sinon la nacelle à échantillon doit être nettoyée.

## Étape 4. Contrôle de la qualité préalable à la mesure

Deux échantillons de matériaux de référence certifiés AIEA-086 contenant environ 5 ng de mercure (environ 8,7 mg de matériau) doivent être analysés avec les paramètres suivants (paramètres d'orientation, qui doivent être optimisés pour chaque instrument selon les instructions du fabricant) :

- température de séchage : 200°C
- temps de séchage : 60 s
- température de décomposition : 650°C
- temps de décomposition : 150 s
- temps de purge : 60 s

La concentration déterminée pour le deuxième échantillon de matériau de référence doit se trouver dans la plage d'incertitude correspondant au point décrit pour la validation. Si ce n'est pas le cas, répéter la mesure jusqu'à obtenir une valeur appartenant à cette fourchette. Réétalonner le système si la valeur visée n'est pas obtenue après cinq tentatives.

Une fois que les quatre étapes précédentes ont bien été réalisées, l'analyseur de mercure direct est prêt pour l'analyse des échantillons.

### 2.6.2. Détermination analytique

#### Pesée des échantillons

Les nacelles de combustion et le support utilisé pour peser les échantillons de cheveux doivent être manipulés à l'aide d'une pince.

Mettre le support de la nacelle de combustion sur la balance. Mettre une nacelle de combustion en nickel au-dessus du support et régler la balance à zéro.

Ouvrir la fiole contenant l'échantillon et transférer de petites portions de cheveux dans la nacelle de combustion, à l'aide d'une spatule, jusqu'à atteindre un poids de 3,0-6,0 mg.

Mettre la nacelle de combustion contenant l'échantillon sur le bac d'échantillons et noter le code,

le poids et l'emplacement de l'échantillon dans le registre de pesée. Préparer trois répliquats pour chaque échantillon.

La spatule doit être nettoyée avec de l'éthanol à 70 % après chaque échantillon.

Afin de s'assurer que l'analyseur effectue des mesures correctes, un échantillon de contrôle de la qualité composé de matériau de référence et atteignant un certain poids, qui variera de manière aléatoire entre les points inclus sur la courbe d'étalonnage, devra être pesé tous les trois échantillons (neuf nacelles de combustion).

### Analyse de l'échantillon

Mettre les nacelles de combustion en nickel contenant les échantillons et les contrôles de qualité dans l'échantillonneur automatique de l'analyseur de mercure direct dans l'ordre dans lequel elles ont été pesées.

Il faut ensuite programmer les échantillons et les contrôles de qualité en entrant leur code et leur poids et en choisissant la méthode et le dernier étalonnage valide pour les cheveux humains. Les paramètres de la méthode sont les suivants (les paramètres d'orientation doivent être optimisés pour chaque instrument selon les instructions du fabricant) :

- température de séchage : 200°C
- temps de séchage : 60 s
- température de décomposition : 650°C
- temps de décomposition : 150 s
- temps de purge : 60 s

Dans ces conditions, le délai d'analyse pour chaque échantillon est d'environ cinq minutes.

#### 2.6.3. Calcul des résultats analytiques

L'équipement affiche directement les données sous forme de nanogrammes de mercure par milligramme de cheveux (ng Hg/mg) par interpolation de la mesure de la courbe d'étalonnage.

La valeur finale affichée correspond à la moyenne des trois mesures répliquées par échantillon. L'écart-type de ces mesures peut être calculé en fonction de la formule suivante.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (c_i - \bar{c})^2}{n - 1}}$$

SD – écart-type

$c_i$  – valeur d'un échantillon individuel

$\bar{c}$  – moyenne

n – nombre de mesures

L'incertitude de la mesure peut être calculée à l'aide de la formule obtenue lors de la procédure de validation.

#### 2.6.4. Plage de résultats mesurables

Les valeurs de mercure sont mesurables dans l'intervalle entre la limite de quantification (1 ng de mercure) et la référence d'étalonnage la plus élevée (25 ng de mercure).

Si la quantité de mercure obtenue dans l'échantillon se trouve en dehors de cette plage, il convient de tester à nouveau l'échantillon selon la procédure suivante.

- Si la valeur est inférieure à 1 ng (la concentration de mercure la plus faible de l'étalonnage), en fonction de la concentration obtenue, prélever la quantité nécessaire de cheveux pour trois nouveaux répliquats afin d'obtenir un nouveau résultat qui se situe dans la plage d'étalonnage.

Compte tenu du contenu organique de l'échantillon et de la capacité des nacelles en nickel utilisées, l'échantillon introduit dans l'analyseur de mercure direct DMA-80 doit peser au maximum 100 mg.

- Si la valeur est supérieure à 25 ng (la référence de mercure la plus élevée de l'étalonnage), en fonction de la concentration obtenue, prélever la quantité nécessaire de cheveux pour trois nouveaux réplicats afin d'obtenir un nouveau résultat qui se situe dans la plage d'étalonnage. L'échantillon ne doit pas peser moins d'un mg.

Seules les mesures obtenues entre deux contrôles de la qualité dont les valeurs s'inscrivent dans la plage établie (valeur attribuée pour le matériau de référence  $\pm$  incertitude pour ce niveau) sont considérées comme valides. Un nouvel étalonnage doit avoir lieu si les valeurs des échantillons de contrôle de la qualité ne s'inscrivent pas dans l'intervalle établi.

Si la concentration de l'un des réplicats ne s'inscrit pas dans la fourchette déterminée par la moyenne  $\pm$  incertitude, le test de Dixon doit être effectué pour déterminer si la valeur douteuse doit être écartée.

$$Q = \frac{X_{\text{suspected}} - X_{\text{neares}}}{X_{\text{highest}} - X_{\text{lowest}}}$$

Q – valeur Q à évaluer en fonction du test Q de Dixon

X – valeur simple (valeur douteuse, valeur la plus proche de la valeur douteuse, valeur la plus élevée et valeur la plus faible)

Si la valeur Q est supérieure ou égale à 0,970, la valeur douteuse peut être rejetée et la concentration de l'échantillon peut être calculée comme la moyenne des deux valeurs restantes. Si Q est inférieure à cette valeur, l'échantillon doit être analysé à nouveau.

## 2.7. Contrôle de la qualité

La précision et l'exactitude des analyses de biomarqueurs effectuées par les laboratoires de toxicologie doit être constamment vérifiée au moyen de mesures d'assurance de la qualité.

En général, l'assurance de la qualité dans les laboratoires s'articule autour de contrôles internes et externes de la qualité (voir également le *Programme de contrôle de la qualité pour la biosurveillance humaine du mercure*).

### 2.7.1. Contrôle interne de la qualité

L'assurance interne de la qualité vise à contrôler systématiquement la répétabilité, à détecter les erreurs aléatoires et à évaluer l'exactitude des études quantitatives menées par les laboratoires.

Dans la pratique, la répétabilité est surveillée au moyen d'un matériau de contrôle (matériau de référence), mesuré dans le cadre de chaque série d'analyses. Les résultats du contrôle interne de la qualité – de la journée ou d'un lot – sont saisis dans des graphiques de contrôle.

Si le matériau de contrôle n'est pas commercialisé, il est possible de le préparer en ajoutant une quantité fixe d'analyte (biomarqueur) dans un contingent de matériaux biologiques humains (sang, urine, etc.). Les aliquots prélevés sur ce contingent peuvent servir tant au contrôle interne de la qualité que dans le cadre de programmes de comparaisons interlaboratoires. Il est établi que ces aliquots sont, et restent homogènes, à condition d'être stockés et acheminés dans des conditions spécifiques, et que la concentration de l'analyte reste stable. Le matériau de contrôle doit couvrir tout le spectre des concentrations (faible, moyenne, élevée, par exemple) et également inclure les blancs.

L'exactitude doit être testée de préférence à l'aide des matériaux de référence certifiés. Un matériau de référence certifié est un matériau (biologique) qui contient une concentration certifiée d'un ou de plusieurs analytes. La certification s'effectue dans le cadre d'un programme, au cours duquel des laboratoires de pointe spécialisés dans l'analyse du biomarqueur en question procèdent au dosage des matériaux de contrôle.

Une valeur certifiée est établie pour chaque analyte, à l'issue d'une procédure de validation par des experts et de procédures statistiques. Les matériaux de référence certifiés sont par conséquent onéreux, et ne doivent être utilisés qu'aux fins de validation ou de revalidation d'une méthode d'analyse.

Les matériaux de contrôle de la qualité utilisés dans cette procédure opératoire standardisée permettent d'évaluer l'exactitude et la précision du processus d'analyse, et de déterminer si les résultats produits par le système analytique sont suffisamment exacts et précis.

Deux matériaux de référence composés de cheveux contenant différents niveaux de mercure, à savoir le NIES MRC No.13 (4,42 ng/mg) et le matériau de référence AIEA-086 (0,573 ng/mg), ont été utilisés pour évaluer la méthode.

Des contrôles de la qualité composés d'un matériau de référence d'un poids spécifique variant aléatoirement en fonction des points inclus sur la courbe d'étalonnage sont effectués tous les trois échantillons (neuf mesures).

Seules les mesures obtenues entre deux contrôles de la qualité dont les valeurs s'inscrivent dans la plage établie (valeur attribuée pour le matériau de référence  $\pm$  incertitude pour ce niveau) sont considérées comme valides.

Deux échantillons de cheveux sont mesurés en aveugle chaque année dans le cadre du programme de contrôle interne de la qualité.

### 2.7.2. Contrôle externe de la qualité

Le contrôle externe de la qualité constitue un moyen d'améliorer la comparabilité et l'exactitude des résultats analytiques. La comparabilité est un gage d'exactitude : elle permet de comparer les résultats analytiques entre laboratoires et avec les seuils correspondants. La comparabilité et l'exactitude en matière de biosurveillance humaine sont nécessaires pour assurer l'égalité de la santé préventive, quel que soit le laboratoire d'analyses médicales concerné.

L'enquête de comparaison interlaboratoire constitue un moyen d'harmoniser les méthodes d'analyse et leur application et partant, d'améliorer la comparabilité des résultats analytiques. À cet effet, il est possible d'utiliser des matériaux de contrôle (matériaux de référence). Les enquêtes de comparaison interlaboratoire sont nécessaires même si les laboratoires d'analyse appliquent la même procédure opératoire standardisée.

Le programme d'évaluation externe de la qualité constitue un moyen d'améliorer l'exactitude des résultats analytiques. À cet effet, l'analyse du matériau de contrôle s'effectue généralement dans des laboratoires de référence spécialisés dans l'analyse d'un biomarqueur particulier. C'est à partir des résultats obtenus par ces laboratoires de référence que sont déterminés les valeurs et les intervalles de tolérance pour chacun des biomarqueurs analysés. Les établissements participant à un programme d'évaluation externe de la qualité reçoivent une certification pour les résultats s'inscrivant dans l'intervalle de tolérance.

Le contrôle externe de la qualité est réalisé sous forme de participation à des essais circulaires (trois fois par an). Par exemple, il est recommandé de participer régulièrement au Programme d'assurance qualité externe multiélément (QMEQAS) organisé par le Centre de toxicologie du Québec - Institut National de Santé Publique (Canada).

## 2.8. Évaluation de la méthode

### 2.8.1. Fonction de réponse

La relation entre la réponse d'un instrument d'analyse et la concentration ou la quantité d'un analyte introduite dans l'instrument est appelée « courbe d'étalonnage ».

Pour cette procédure opératoire standardisée, la réponse de la méthode a été testée pour la fourchette 0-25 ng de mercure et un modèle de régression quadratique a été établi pour la courbe d'étalonnage.

Les données obtenues sont analysées statistiquement pour calculer la courbe de régression et le coefficient de détermination.

La courbe ainsi obtenue doit avoir avec un coefficient de détermination supérieur à 0,997.

### 2.8.2. Précision

Il s'agit ici de mesurer la dispersion des résultats analytiques due à des erreurs aléatoires.

La précision se traduit de manière statistique par un écart-type ou un intervalle de confiance. Nous pouvons distinguer deux types de précision :

- la précision dans des conditions répétées (répétabilité)
- la précision dans des conditions comparables (reproductibilité)

Les matériaux utilisés pour effectuer ces mesures doivent être identifiés et les méthodes de calcul définies.

Les différents niveaux de mercure inclus dans l'étalonnage (cf. paragraphe 2.5) ont été mesurés en triplicat sur 16 jours différents, par deux analystes différents, pour établir la précision de chaque niveau, qui peut être trouvée dans les tableaux 4-6.

Tableau 4. Écart type maximal permis

Concentration (ng Hg)	RSDrepro	RSDrepet
1	4,9	6,4
2,5	4,1	4,9
5	3,4	3,6
10	1,2	2,3
15	0,8	1,4
20	0,5	0,9
25	0,3	1,1

Hg = mercure ; ng = nanogramme ; RSDrepet = écart-type relatif de la répétabilité ; RSDrepro = écart-type relatif de la reproductibilité.

### 2.8.3. Exactitude

Il s'agit ici de mesurer l'écart entre la valeur mesurée et la valeur correcte (« juste ») dû à une erreur systématique. Il est possible de tester l'exactitude de la méthode en analysant les variables suivantes :

- l'organisation de tests de récupération (procédures par ajout connu) ;
- la participation à des enquêtes de comparabilité interlaboratoires dans lesquelles la valeur théorique est vérifiée par des laboratoires de référence agréés ;
- la comparaison de la procédure analytique à valider avec une procédure de référence certifiée, afin de déterminer le paramètre dans la matrice de prélèvement correspondante ;
- la comparaison des résultats analytiques pour un matériau de référence certifié avec la valeur de référence certifiée.

Dans ce cas précis, deux matériaux de référence composés de cheveux contenant différents niveaux de mercure, à savoir le NIES MRC No.13 (4,42 ng/mg) et le matériau de référence AIEA-086 (0,573 ng/mg) ont été utilisés pour déterminer l'exactitude de la méthode.



Les différents niveaux de mercure inclus dans l'étalonnage (voir le paragraphe 2.5) ont été mesurés pour déterminer l'exactitude de chaque niveau. Les taux de récupération sont résumés dans le tableau 5.

Les taux de récupération, en prenant en compte l'incertitude de la mesure, doivent arriver à 100 %. Si ce n'est pas le cas, le point correspondant à la concentration initiale sur la courbe d'étalonnage doit être ré-évalué en fonction de la limite de quantification obtenue pour la méthode.

**Tableau 5. Concentrations de mercure et taux de récupération**

Concentration (ng Hg)	Récupération (%)	Intervalle (%)
1	101,7	83,2-131,0
2,5	99,5	88,5-126,2
5	100,9	94,5-135,7
10	98,5	88,2-102,7
15	100,6	97,7-106,7
20	100,4	97,8-103,1
25	99,7	97,1-130,2

Hg = mercure ; ng = nanogramme.

#### 2.8.4. Incertitude

Cela correspond à l'estimation de la plage ou de la fourchette globale de confiance pour les résultats mesurés après avoir pris en compte les erreurs possibles. L'incertitude-type des mesures équivaut à l'écart-type d'une série de mesures. L'incertitude-type combinée des mesures recouvre toutes les étapes de travail, les facteurs d'interférence et d'influence ainsi que leur influence réciproque. L'incertitude élargie des mesures inclut la fonction de l'intervalle de confiance.

L'incertitude pour chacun des niveaux de mercure évalué figure dans le tableau 6.

**Tableau 6. Concentrations de mercure et niveau d'incertitude**

Concentration (ng Hg)	Incertitude (%)
1	18,0
2,5	11,3
5	10,0
10	5,5
15	4,9
20	4,7
25	4,6

Hg = mercure ; ng = nanogramme.

L'incertitude a été calculée conformément aux *EA guidelines on the expression of uncertainty in quantitative testing (EA-4/16)* [Lignes directrices de *European Accreditation* pour l'expression de l'incertitude des résultats d'essais quantitatifs] (14) et au *Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure* (15).

### 2.8.5. Limite de quantification

La limite de quantification inférieure indique la quantité minimale d'analyte pouvant être dosée en appliquant une incertitude prédéfinie (généralement 33 %). La limite de quantification supérieure indique la quantité maximale d'analyte pouvant être dosée.

La limite de quantification doit être prise en compte dans la courbe d'étalonnage et peut être calculée à l'aide de plusieurs méthodes.

#### Calcul du ratio signal/bruit de fond

Le bruit de fond est calculé comme suit.

- L'intensité du bruit de fond ( $s_0$ ) est calculée en rapport avec l'analyte.
- La limite de détection est calculée comme étant trois fois supérieure à l'intensité moyenne du signal du bruit de fond ( $LDD = 3 \times s_0$ ).
- La limite de quantification est calculée comme étant neuf fois supérieure à l'intensité moyenne du signal du bruit de fond ( $LDQ = 9 \times s_0$ ).

#### Autres procédures

Il convient de noter que les valeurs à blanc des échantillons d'origine influent sur le choix de la méthode et de l'approche :

- procédure de l'écart-type (selon EURACHEM)
- procédure de la valeur à blanc (selon DIN 32 645)
- procédure de la courbe d'étalonnage (selon DIN 32 645)

Dans cette procédure opératoire standardisée, la limite de quantification a été calculée en utilisant la procédure de la courbe d'étalonnage, et le résultat obtenu est inférieur à la valeur la plus faible de cette courbe, soit 1 ng de mercure, donc cela correspondra à la limite de quantification appliquée.

Si l'on considère un échantillon de 100 mg (poids maximal), la limite de quantification en matière de concentration est de 0,01 ng de mercure/mg de cheveux.

## 3. Interprétation des données

La toxicité du méthylmercure constitue un problème de santé publique majeur, étant donné que la population générale y est exposée à travers son régime alimentaire. Cette situation est particulièrement préoccupante pour les fœtus, les très jeunes enfants, les femmes enceintes et celles en âge de procréer, en raison de la capacité du méthylmercure à traverser la barrière du placenta et la barrière hémato-encéphalique, ce qui a des répercussions graves sur le développement du système nerveux. Bien que les effets neurologiques du méthylmercure soient bien connus depuis des années, il est difficile de déterminer une valeur de recommandation sanitaire puisqu'il est très complexe d'évaluer les effets néfastes résultant d'une exposition chronique aux niveaux présents dans l'environnement. Ceci est d'autant plus vrai que l'éventail et la magnitude des effets neurologiques entraînés par le méthylmercure varient en fonction du moment où a lieu l'exposition. Selon les observations, les effets

chez les adultes sont localisés dans certaines régions du cerveau, tandis qu'une exposition durant la phase de développement entraîne des effets plus prolongés et plus étendus. Dans ce dernier cas, les processus de division et de migration des neurones sont affectés et la cytoarchitecture du cerveau est altérée (16-18). En raison des différences de lésions, les signes cliniques sont également distincts, comme observé à Minamata après l'empoisonnement à grande échelle dont a souffert la population. Par conséquent, les symptômes chez les adultes sont des troubles sensoriels dans les membres, une ataxie, des problèmes d'ouïe et de vision, des pertes d'équilibre, des troubles de l'élocution et dans les cas les plus graves, des pertes de connaissance et la mort. En revanche, les effets chez les enfants nés après l'incident étaient encore plus graves, avec une palette de troubles très sérieux tels que le retard mental, des réflexes atténués, un fonctionnement cérébelleux défaillant, des troubles de la croissance et nutritionnels, une dysarthrie et une malformation des membres, et dans 75 % à 95 % des cas, un syndrome hyperkinétique, une hypersalivation, le strabisme, et des troubles paroxystiques et du système pyramidal (19).

Bien que l'on ait beaucoup appris sur les effets du méthylmercure sur les êtres humains après la catastrophe de Minamata, la situation est bien différente pour l'exposition environnementale à cette substance. Les niveaux à laquelle la population générale est exposée à travers la consommation de poisson sont significativement moindres que ceux présents dans les poissons après la fuite de Minamata, ce qui rend l'évaluation des effets néfastes très complexe. La difficulté réside dans le fait que l'identification et l'évaluation des effets neurologiques est très complexe, car ils peuvent se présenter de manière subtile et non spécifique, par exemple sous la forme d'un coefficient intellectuel réduit. Il pourrait également y avoir une interaction entre les effets néfastes du méthylmercure et les nutriments présents dans le poisson. Le poisson est un aliment de haute qualité qui apporte des acides polyinsaturés et d'autres nutriments qui sont essentiels au développement normal du système nerveux et peuvent contrer les effets nocifs du méthylmercure (20,21). C'est l'une des hypothèses qui a été avancée pour expliquer les variations observées entre les études portant sur les Îles Féroé, les Seychelles et la Nouvelle-Zélande. Cette incertitude concernant les effets résultant d'une exposition de faible niveau s'applique également à d'autres effets néfastes qui ont été reliés à l'exposition au méthylmercure (par ex., des effets d'ordre cardiovasculaire et immunologique) (22).

Compte tenu de ce qui précède, il est difficile d'interpréter la concentration de mercure détectée dans les cheveux, ce qui est illustré par l'absence de valeur de recommandation sanitaire acceptée pour appuyer l'interprétation des données.

L'interprétation des concentrations de mercure dans les cheveux nécessite la collecte d'informations de base sur l'exposition à cette substance. Ces informations peuvent être rassemblées en incluant des questions spécifiques dans le questionnaire épidémiologique. Le questionnaire doit comprendre plusieurs sections sur la description du régime alimentaire, étant donné que celui-ci constitue une source importante d'exposition au mercure présent dans l'environnement et que certains nutriments influent sur l'absorption de cette substance (12,22-25). La concentration du méthylmercure dans le poisson varie en fonction de l'espèce et de la taille du poisson et de la région où celui-ci est pêché (26-29). Par conséquent, il convient de demander aux sujets de décrire la fréquence de leur consommation et le type de poisson consommé.

Si l'on part du principe que les cheveux poussent de 1 cm par mois, la longueur du segment analysé fournira des informations sur l'exposition dans le temps. Comme le régime alimentaire peut varier en fonction des saisons, ce qui peut entraîner des variations dans les niveaux de mercure présents dans les cheveux, il est conseillé d'inclure des questions sur le régime alimentaire adopté à différentes périodes (par ex., fréquence habituelle de la consommation de poisson et fréquence durant les trois derniers mois).

### 3.1. Valeurs à interpréter

La définition des valeurs de référence pour les études de biosurveillance humaine permet d'établir une comparaison entre les populations. Ces valeurs représentent la concentration chimique chez une population spécifique (ou un sous-groupe) à la suite d'une exposition à un moment précis et sont dérivées d'une analyse de la concentration dans les cheveux, le sang, l'urine et d'autres matrices

biologiques. Les valeurs de références sont généralement basées sur le 90<sup>e</sup> ou le 95<sup>e</sup> centile et l'intervalle de confiance de 95 % correspondant (30,31) ; elles peuvent être représentatives de la population générale ou seulement de groupes spécifiques. Toutefois, ces valeurs doivent être révisées et mises à jour car elles décrivent une population particulière à l'instant T et peuvent être influencées par différents facteurs, notamment l'âge, la région, les habitudes et les modes de vie, les polymorphismes génétiques et même par une amélioration des techniques d'analyse (32).

Les valeurs de référence sont une description statistique de la fourchette typique de concentration au sein des populations de référence et ne sont pas des valeurs de recommandation sanitaire (31). Pour interpréter les niveaux d'un composé présent dans le corps d'un point de vue toxicologique, il est nécessaire de déterminer des valeurs de recommandation sanitaire. Il convient de privilégier pour la biosurveillance humaine les valeurs définies par la Commission de biosurveillance humaine allemande ; toutefois, ces valeurs n'ont été définies que pour certains composés. Ces valeurs pour la biosurveillance humaine fournissent un barème précis pour interpréter les résultats individuels et définir les mesures à prendre, selon que ces mesures sont supérieures ou inférieures aux valeurs HBM-I et HBM-II.

Les « équivalents de biosurveillance » sont également des valeurs de recommandation sanitaire utiles pour interpréter les données des études de biosurveillance humaine. Ils sont définis comme la concentration d'une substance chimique (ou d'un métabolite) dans les cheveux, le sang, l'urine ou un autre tissu qui est compatible avec une valeur guide d'exposition, comme une dose journalière tolérable (DJT), une dose de référence (DRf), une concentration de référence (CRf) ou des doses associées à un risque (26). Toutefois, les équivalents de biosurveillance ne donnent pas de valeur limite permettant de faire la distinction entre une exposition sans danger et une exposition dangereuse ; ils ne signifient pas que des effets néfastes apparaîtront une fois que ces seuils ont été dépassés. En fait, ils ne doivent pas servir à interpréter des données individuelles à des fins d'estimation des risques d'apparition d'effets néfastes (33).

Dans le cas du mercure dans les cheveux, aucune valeur n'a été définie pour la biosurveillance humaine. Cependant, la valeur définie par la Commission de biosurveillance humaine allemande a été dérivée d'une concentration de mercure dans les cheveux de 5 mg/kg (34) et ce chiffre peut donc être utilisé pour interpréter les niveaux de mercure dans les cheveux. Le tableau 7 présente les valeurs de différentes agences qui sont généralement utilisées pour interpréter les niveaux de mercure détectés dans les cheveux. Il convient cependant de noter que ces valeurs sont définies pour les groupes vulnérables (enfants, femmes en âge de procréer et femmes enceintes) plutôt que pour la population générale.

En plus des valeurs du tableau 7, les données obtenues peuvent être comparées aux valeurs de référence (95<sup>e</sup> centile) obtenues dans d'autres études ; toutefois, compte tenu des commentaires ci-dessus concernant les valeurs de référence, il faut que les groupes de populations soient aussi comparables que possible (par ex., même tranche d'âge, modes de vie similaires, même période, etc.)

**Tableau 7. Concentrations de mercure et niveau d'incertitude**

Agence	Niveaux dans les cheveux	Référence
Agence de protection de l'environnement, États-Unis d'Amérique (US EPA)	1,0 µg/g	(35)
Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA)	1,9 µg/g	(29)
Agence fédérale allemande pour l'environnement (UBA)	5,0 µg/g	(34)

## Références

1. Harkins D. K., Sustens A. S., Hair analysis: exploring the state of the science, *Environ Health Perspect*, 2003, 111:576–8 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1241447/pdf/ehp0111-000576.pdf>, accessed 31 January 2018).
2. Srogi K., Mercury content of hair in different populations relative to fish consumption, *Rev Environ Contam Toxicol*, 2007, 189:107–30 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17193738>, accessed 31 January 2018).
3. Mcdowell M. A., Dillon C. F., Osterloh J., Bolger P. M., Pellizzari E., Fernando R. et al., Hair mercury levels in U.S. children and women of childbearing age: reference range data from NHANES 1999–2000, *Environ Health Perspect*, 2004, 112:1165–71 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1247476/>, accessed 31 January 2018).
4. Harkey M. R., Anatomy and physiology of hair, *Forensic Sci Int*, 1993, 63:9–18 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8138238>, accessed 31 January 2018).
5. Tobin D. J., *Hair in toxicology: An important bio-monitor*, Cambridge, RSC Publishing, 2005.
6. Instituto de Salud Carlos III [site Web]. Madrid, Instituto de Salud Carlos III, 2018 ([http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-el-instituto/fd-organizacion/fd-estructura-directiva/fd-subdireccion-general-servicios-aplicados-formacion-investigacion/fd-centros-unidades/fd-centro-nacional-sanidad-ambiental/fd-servicios-cientifico-tecnicos\\_sanidad-ambiental/sc-t-cnsa-toxicologia-ambiental.shtml](http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-el-instituto/fd-organizacion/fd-estructura-directiva/fd-subdireccion-general-servicios-aplicados-formacion-investigacion/fd-centros-unidades/fd-centro-nacional-sanidad-ambiental/fd-servicios-cientifico-tecnicos_sanidad-ambiental/sc-t-cnsa-toxicologia-ambiental.shtml), accessed 31 January 2018).
7. Esteban M., Schindler B. K., Jiménez-Guerrero J. A., Koch H. M., Angerer J., Rosado M. et al., Mercury analysis in hair: Comparability and quality assessment within the transnational, COPHES/DEMOCOPHES project, *Environ Res*, 2014, 141:24–30 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25483984>, accessed 31 January 2018).
8. Jiménez-Guerrero J. A., Navarro C., Cañas A., Lucena A., Castaño A., Development, validation and ISO/IEC 17025:2005 accreditation of an atomic absorption method to determine total mercury in human hair, 8th International Symposium on Biological Monitoring in Occupational and Environmental Health, Espoo, Finland, 6–8 September 2010
9. Veiga M. M., Baker R. F., *Protocols for environmental and health assessment of mercury released by artisanal and small-scale gold miners*. Vienna: United Nations Industrial Development Organization; 2004.
10. Li Y. F., Chen C., Li B., Wang J., Gao Y., Zhao Y., Chai Z., Scalp hair as a biomarker in environmental and occupational mercury exposed populations: suitable or not?, *Environ Res*, 2008, 107:39–44 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013935107001430?via%3Dihub>, accessed 31 January 2018).
11. Fewtrell L., Kaufmann R., Prüss-Üstün A., editors, *Lead: Assessing the environmental burden of disease at national and local levels*. Geneva: World Health Organization; 2003 ([http://www.who.int/quantifying\\_ehimpacts/publications/en/leadebd2.pdf](http://www.who.int/quantifying_ehimpacts/publications/en/leadebd2.pdf), accessed 31 January 2018).
12. *Guidance for identifying populations at risk from mercury exposure*. Geneva: United Nations Environment Programme/World Health Organization; 2008 (<http://www.who.int/foodsafety/publications/risk-mercury-exposure/en/>, accessed 31 January 2018).
13. DMA 80, In : Milestone [site Web], Sorisole, Milestone, 2018 (<https://www.milestonesrl.com/en/mercury/dma-80/>, accessed 31 January 2018).
14. EA guidelines on the expression of uncertainty in quantitative testing (EA-4/16), European Accreditation, 2003 (<http://www.european-accreditation.org/publication/ea-4-16-g-rev00december-2003-rev>, accessed 19 January 2018).

15. *Évaluation des données de mesure – Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure*, Groupe de travail 1 du Comité commun pour les guides en métrologie (JCGM/WG 1), 2008 ([https://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM\\_100\\_2008\\_F.pdf](https://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM_100_2008_F.pdf), consulté le 15 juillet 2019).
16. Clarkson T. W., Mercury: major issues in environmental health, *Environ Health Perspect*, 1992, 100:31-38 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1519577/>, accessed 31 January 2018).
17. Castoldi A. F., Coccini T., Ceccatelli S., Manzo L., Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury, *Brain Res Bull*, 2001, 55:197–203 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11470315>, accessed 31 January 2018).
18. Johansson C., Castoldi A. F., Onishchenko N., Manzo L., Vahter M., Ceccatelli S., Neurobehavioural and molecular changes induced by methylmercury exposure during development, *Neurotox Res*, 2007, 11:241–60 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17449462>, accessed 31 January 2018).
19. Harada M., Congenital Minamata disease: Intrauterine methylmercury poisoning, *Teratology*, 1978, 18:285–8 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/362594>, accessed 31 January 2018).
20. Myers G. J., Davidson P. W., Strain J. J., Nutrient and methyl mercury exposure from consuming fish, *J Nutr*, 2007, 137:2805–8 (<https://pdfs.semanticscholar.org/d543/5eed77f9079b1057cbd5a66b28d8f7778fd6.pdf>, accessed 31 January 2018).
21. Choi A. L., Cordier S., Weihe P., Grandjean P., Negative confounding in the evaluation of toxicity: the case of methylmercury in fish and seafood, *Crit Rev Toxicol*, 2008, 38:877-93 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2597522/>, accessed 31 January 2018).
22. Karagas M. R., Choi A. L., Oken E., Horvat M., Schoeny R., Kamai E. et al., Evidence on the human health effects of low-level methylmercury exposure, *Environ Health Perspect*, 2012, 120:799–806 (<https://ehp.niehs.nih.gov/1104494/>, accessed 31 January 2018).
23. Champan L., Chan H. M., The influence of nutrition on methylmercury intoxication, *Environ Health Perspect*, 2000, 108(1):29–56 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1637774/>, accessed 31 January 2018).
24. Chen C. Y., Serrel N., Evers D. C., Fleishman B. J., Lambert K. F., Weiss J. et al., Meeting report: Methylmercury in marine ecosystems – from sources to seafood consumers, *Environ Health Perspect*, 2008, 116:1706–12 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2599767/>, accessed 31 January 2018).
25. Castaño A., Cutanda F., Esteban M., Pärt P., Navarro C., Gómez S. et al., Fish consumption patterns and hair mercury levels in children and their mothers in 17 EU countries, *Environ Res*, 2015, 141:58–68. doi: 10.1016/j.envres.2014.10.029.
26. National Research Council. Toxicological effects of methylmercury, Washington, National Academy Press, 2000 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK225778/>, accessed 31 January 2018).
27. Burger J., Gochfeld M., Mercury and selenium levels in 19 species of saltwater fish from New Jersey as a function of species, size, and season, *Sci Total Environ*, 2011, 409:1418–29 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4300121/>, accessed 31 January 2018).
28. Miniero R., Abate V., Brambilla G., Davoli E., De Felip E., De Filippis S. P. et al., Persistent toxic substances in Mediterranean aquatic species, *Sci Total Environ*, 2014, 494–495:18–27 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969714008237?via%3Dihub>, accessed 31 January 2018).
29. European Food Safety Authority. Scientific opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food, *EFSA Journal*, 2012, 10(12):2985 (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2012.2985/abstract>, accessed 31 January 2018).



30. Poulsen O. M., Holst E., Christensen J. M., Calculation and application of coverage intervals for biological reference values, *Pure Appl Chem*, 1997, 69:1601–11 (<https://doi.org/10.1351/pac199769071601>, accessed 31 January 2018).
31. Ewers U., Krause C., Schulz C., Wilhelm M., Reference values and human biological monitoring values for environmental toxins, *Int Arch Occup Environ Health*, 1999, 72:255–60 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10491780>, accessed 31 January 2018).
32. Manini P., De Palma G., Mutti A., Exposure assessment at the workplace: Implications of biological variability, *Toxicol Lett*, 2007, 168:210–18 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17157456>, accessed 31 January 2018).
33. Hays M. S., Aylward L. L., Interpreting human biomonitoring data in a public health risk context using Biomonitoring Equivalents, *Int J Hyg Environ Health*, 2012, 215:145–48 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438463911002331?via%3Dihub>, accessed 31 January 2018).
34. UBA, Substance monograph: Mercury – reference values and human biomonitoring (HBM) levels. Opinion of the Human Biomonitoring Commission of the German Environmental Agency, Dessau-Roßlau, Umweltbundesamt, 1999.
35. Mercury study report to congress. Vol. IV: An assessment of exposure to mercury in the United States. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency; 1997 (<https://www3.epa.gov/airtoxics/112nmerc/volume4.pdf>, accessed 31 January 2018)
36. Evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Technical Report Series 922. Sixty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva: World Health Organization; 2004 ([http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42849/1/WHO\\_TRS\\_922.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42849/1/WHO_TRS_922.pdf), accessed 31 January 2018).

# Annexe 1. Registre des échantillons de cheveux collectés

ORIGINE :      CENTRE : ADRESSE : VILLE/PAYS : CONTACT (NOM ET TÉLÉPHONE) :			
Code ID	Date de prélèvement (jj/mm/aa)	Questionnaire sur le prélèvement attaché (O/N)	Commentaires

Date d'expédition :

Nom et signature de l'agent de terrain :



## Annexe 2. Questionnaire sur le prélèvement de cheveux

Code ID :  
Date de l'entretien :  
Lieu du prélèvement :  
Agent de terrain :

### 1. Échantillon prélevé

Oui  Non Raisons : .....

### 2. Date du prélèvement (jj/mm/aaaa): \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### 3. Couleur de cheveux naturelle :

Noir  Blond  
 Châtain foncé  Gris  
 Châtain  Blanc  
 Roux

### 4. Type naturel des cheveux :

Raides  
 Ondulés  
 Bouclés

### 5. Les cheveux ont-ils été teints/colorés durant les 6 derniers mois ?

Non  Oui Il y a.....mois  
Il y a.....semaines

### 6. Les cheveux ont-ils été traités durant l'année écoulée, par exemple permanentés ou lissés ?

Non  Oui Il y a.....mois  
Il y a.....semaines

### 7. Dernier lavage des cheveux :

Il y a.....jours  
 Hier  
 Aujourd'hui

### 8. Longueur des cheveux prélevés (depuis le cuir chevelu) : \_\_\_\_ cm

### 9. Étiquetage de l'échantillon :

Oui  Non Raisons : .....

### 10. Commentaires :

**Remarque.** Ce questionnaire ne collecte que des informations basiques concernant l'échantillon de cheveux. Les informations concernant l'exposition au mercure ne sont pas incluses.

# Annexe 3. Registre de réception des échantillons

---

## 1. ORIGINE DE L'ÉCHANTILLON :

Centre :

Ville/Pays :

Date du prélèvement :

---

## 2. ÉCHANTILLON REÇU :

Signature de l'analyste :

Urine

Cheveux

Sang ombilical

---

## 3. RÉCEPTION DE L'ÉCHANTILLON :

Date  
(jj/mm/aa)

Heure  
(hh:mm)

### A) EMBALLAGE

AUCUN PROBLÈME DÉTECTÉ

PROBLÈME DÉTECTÉ :

Emballage endommagé

Agents de refroidissement décongelés

Autres : \_\_\_\_\_

### B) ÉCHANTILLONS

AUCUN PROBLÈME DÉTECTÉ

PROBLÈME DÉTECTÉ :

Quantité insuffisante/volume insuffisant (préciser la matrice)\_\_\_

Incohérence dans les codes ID

Autres : \_\_\_\_\_

### C) DOCUMENTS

AUCUN PROBLÈME DÉTECTÉ

PROBLÈME DÉTECTÉ :

Absence du registre des échantillons collectés

Absence du questionnaire sur le prélèvement de cheveux

Absence du questionnaire de l'étude

Incohérence dans les codes ID

Autres : \_\_\_\_\_

---

## 4. DATE DE DÉPÔT/DE MISE EN BANQUE :

---

## 5. COMMENTAIRES :

---

### CODES ID DES ÉCHANTILLONS CONNEXES

Sang ombilical      Urine

# Annexe 4. Liste de contrôle avant le prélèvement

**1. Le matériel de prélèvement est-il prêt pour le terrain ?**

- Alcool et coton
- Gants en latex
- Ciseaux
- Étiquettes ID
- Marqueur permanent
- Ruban adhésif
- Sacs en papier
- Sachets en plastique refermables

**2. Tous les documents concernant l'échantillon sont-ils prêts ?**

- Registre des échantillons collectés
- Questionnaires sur le prélèvement de cheveux
- Formulaire de consentement éclairé

**3. Observation** .....

.....

.....

# Annexe 5. Liste de contrôle après le prélèvement

1. Tous les échantillons sont-ils correctement étiquetés et enregistrés dans le registre des échantillons collectés ?

Oui     Non

*Veillez décrire tout problème détecté et la solution : .....*

.....  
.....

2. Tous les formulaires de consentement éclairé sont-ils signés et étiquetés ?

Oui     Non

*Veillez décrire tout problème détecté et la solution : .....*

.....  
.....

3. Tous les questionnaires de prélèvement ont-ils été correctement remplis et étiquetés ?

Oui     Non

*Veillez décrire tout problème détecté et la solution : .....*

.....  
.....

4. Y a-t-il une cohérence entre les codes ID des échantillons et ceux des documents ?

Oui     Non

*Veillez décrire tout problème détecté et la solution : .....*

.....  
.....

# Procédure opératoire standardisée pour évaluer le niveau de mercure dans le sang ombilical

(prélèvement, dosage du mercure et interprétation des  
résultats)

## Résumé

Cette procédure opératoire standardisée décrit le processus d'évaluation de l'exposition au mercure à l'aide de la biosurveillance humaine avec du sang ombilical comme matrice biologique. Le prélèvement de sang ombilical, le dosage du mercure et l'interprétation des résultats sont décrits dans ce document.

## Mots-clés

Mercure - analyse  
Composés du méthylmercure - analyse  
Biomarqueurs - analyse  
Sang foetal – chimie  
Cordon ombilical – chimie  
Exposition maternelle  
Échange mère-foetus  
Nourrisson, nouveau-né  
Exposition environnementale

## Contributeurs

Milena Horvat  
Jožef Stefan Institute (Slovénie)  
Darja Mazej  
Jožef Stefan Institute (Slovénie)  
Majda Palvin  
Jožef Stefan Institute (Slovénie)  
Greet Schoeters  
VITO, Boeretang (Belgique)  
Janja Snoj Tratnik  
Jožef Stefan Institute (Slovénie)

# Table des matières

<b>Abréviations .....</b>	<b>75</b>
<b>Introduction : le sang ombilical comme matrice pour la biosurveillance humaine du mercure.....</b>	<b>76</b>
<b>1. Prélèvement de sang ombilical .....</b>	<b>77</b>
1.1. Portée de la méthode.....	77
1.2. Précautions nécessaires .....	77
1.3. Matériel requis.....	77
1.4. Préparation/prétraitement du matériel de prélèvement.....	78
1.5. Procédure de prélèvement.....	78
1.6. Étiquetage .....	79
1.7. Transport et conservation de l'échantillon .....	79
1.8. Réception des échantillons .....	79
1.9. Aliquotage et préparation de l'échantillon .....	80
1.10. Stockage et conservation .....	81
1.11. Contrôle de la qualité : traçabilité.....	81
<b>2. Dosage du mercure dans le sang ombilical .....</b>	<b>81</b>
2.1. Portée de la méthode.....	82
2.2. Principe technique .....	82
2.3. Précautions nécessaires .....	83
2.4. Équipement, matériel et solutions .....	83
2.5. Étalonnage .....	85
2.6. Procédure.....	85
2.7. Contrôle de la qualité.....	89
2.8. Évaluation de la méthode.....	90
<b>3. Interprétation des résultats .....</b>	<b>94</b>
<b>Références .....</b>	<b>96</b>
<b>Annexe 1. Formulaire de prélèvement de sang ombilical .....</b>	<b>98</b>
<b>Annexe 2. Enregistrement des échantillons de sang ombilical .....</b>	<b>99</b>

# Abréviations

Hg	Mercure
ID	Identification
LDD	Limite de détection
LDQ	Limite de quantification

# Introduction : le sang ombilical comme matrice pour la biosurveillance humaine du mercure

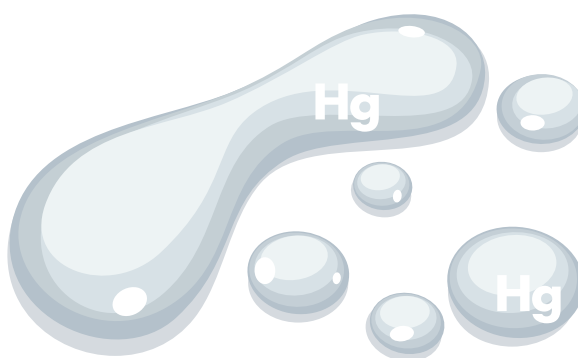
Le mercure (Hg) est un polluant toxique et persistant qui s'accumule dans les organismes vivants et peut opérer une bioamplification via les réseaux alimentaires (1,2). L'exposition humaine au méthylmercure se fait principalement par l'alimentation, en particulier la consommation de poisson d'eau douce et de mer (3). Les humains peuvent également être exposés au mercure élémentaire ou inorganique par inhalation lors d'activités professionnelles ou par l'intermédiaire des amalgames dentaires (4). L'exposition au mercure élémentaire ou inorganique peut également avoir pour origine l'utilisation de crèmes et de savons éclaircissants, la présence de mercure dans certains médicaments traditionnels, l'utilisation de ce métal dans certaines pratiques culturelles, et les déversements accidentels de mercure dans les maisons, les écoles et d'autres lieux (5).

Si la population en général n'est exposée qu'à de faibles quantités de mercure, l'apparition et la gravité des effets néfastes de cette exposition sur la santé dépendent de la forme chimique du mercure, de la dose absorbée, de l'âge ou du stade de développement des personnes exposées (le fœtus est considéré comme étant le plus vulnérable), et la durée et la voie d'exposition (1,6).

Le mercure est particulièrement nocif pour le système nerveux, les reins et le système cardiovasculaire, et les systèmes organiques en développement (comme le système nerveux du fœtus) sont les plus sensibles à ses effets toxiques. Les effets toxiques du mercure élémentaire et du méthylmercure se manifestent principalement sur le système nerveux, tandis que les dérivés inorganiques du mercure s'accumulent surtout dans les reins (1).

Le choix des milieux biologiques utilisés pour évaluer l'exposition humaine dépend des composés du mercure, des schémas d'exposition (par ex. chronique, aiguë) et du moment du prélèvement après l'exposition (7). La présence de mercure dans le sang est le signe d'une exposition brève à du mercure organique et inorganique et ne fournit aucune indication quant à une exposition prolongée et à ses variations (7-9). Les taux de mercure dans le sang ombilical et les cheveux sont de bons biomarqueurs d'une faible exposition prénatale au méthylmercure grâce à son transfert sélectif à travers des barrières biologiques telles que le sang ou les cheveux et le placenta. Le mercure inorganique, lui, n'a pas cette propriété. Les taux dans le sang ombilical sont proportionnés à ceux du sang maternel, tout en étant légèrement plus élevés (10,11). Le taux de mercure dans le sang ombilical est à privilégier comme biomarqueur de l'exposition prénatale car il fournit des informations à la fois sur l'exposition des mères, et sur les expositions prénatales de leurs enfants (12).

Il est plus facile d'associer un déficit neurocomportemental lié au mercure chez l'enfant en mesurant le taux de mercure dans le sang ombilical qu'en le mesurant dans les cheveux de la mère (13). Les concentrations de mercure dans les cheveux peuvent être influencées par plusieurs facteurs, comme la couleur et les différents rythmes de croissance des cheveux, ce qui limite leur efficacité en tant qu'indicateur des concentrations de mercure dans le corps (14). Le sang ombilical est une matrice non invasive, mais il doit être prélevé par un infirmier après la naissance.





# 1. Prélèvement de sang ombilical

## 1.1. Portée de la méthode

Le prélèvement du sang ombilical doit se faire immédiatement après l'accouchement, dans une salle d'accouchement. Il existe deux méthodes de base de prélèvement de sang ombilical :

- Le prélèvement du sang ombilical après la naissance du bébé, mais avant l'évacuation du placenta ; cette pratique, appelée « prélèvement *in utero* », est généralement réalisée par un médecin ou par une sage-femme.
- Le prélèvement du sang ombilical après l'évacuation du placenta et le clampage du cordon ombilical, soit la méthode dite du « prélèvement *ex utero* ». Cette méthode peut être réalisée dans une autre salle par un membre du personnel infirmier ou de l'équipe de recherche.

L'OMS recommande uniquement les méthodes de prélèvement de sang ombilical *ex utero* pour prévenir toute conséquence négative sur la mère et l'enfant.

## 1.2. Précautions nécessaires

Toutes les mesures de précaution à prendre lors de la manipulation des échantillons sanguins s'appliquent également au prélèvement du sang ombilical.

- Opter pour des produits conçus spécialement pour le prélèvement de sang ombilical ; si une aiguille et une seringue sont utilisées, utiliser une aiguille sûre qui peut être séparée du cylindre de la seringue.
- Il est recommandé de porter des gants à tout moment lors du prélèvement du sang ombilical.
- Si les gants sont perforés ou sévèrement contaminés en cours d'utilisation, il convient de les retirer et de les jeter, de se laver les mains et d'enfiler des gants propres.
- Une fois la manipulation des échantillons terminée, il faut toujours retirer et jeter les gants, puis se laver les mains.
- Utiliser du désinfectant si nécessaire.

## 1.3. Matériel requis

Le matériel nécessaire au prélèvement de sang ombilical est le suivant :

- fiche d'enregistrement des échantillons ;
- matériel de prélèvement :
  - aiguilles et seringues ;
  - tube B1 : tube en polypropylène de 50 ml avec 0,5 ml d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) ;
  - tube B2 : tube en polypropylène de 10 ml sans métal.

La maternité doit préalablement se procurer des boîtes de tubes de prélèvement étiquetés auprès d'un laboratoire de recherche.

Des instructions pour contacter le personnel de recherche, ainsi que pour le prélèvement, le stockage et le transport, doivent être fournies.

## 1.4. Préparation/prétraitement du matériel de prélèvement

Tous les tubes doivent être nettoyés à l'aide d'une solution à base d'acide nitrique à 10 % dans de l'eau purifiée afin d'éliminer toute contamination de fond. La procédure détaillée est présentée ci-après.

1. Préparer une solution d'acide nitrique à 10 % à partir d'acide nitrique (65 % extra pur) et d'eau purifiée.
2. Mettre la solution dans un bac.
3. Ouvrir les tubes et mettre les tubes et les couvercles dans le bac. Veiller à ce que tous les éléments soient complètement immergés.
4. Les tubes doivent être immergés dans ce bac pendant au moins trois heures (de préférence toute une nuit).
5. Sortir les tubes du bac d'acide et les mettre dans un bac avec de l'eau purifiée. Secouer les tubes pendant 2-3 minutes. Ensuite, mettre les tubes et les couvercles dans un second bac d'eau purifiée. Secouer à nouveau les tubes pendant 2-3 minutes.
6. Sortir les tubes et les couvercles et les placer à l'envers sur une feuille de papier filtre propre pour les sécher.
7. Une fois le séchage terminé, visser les couvercles des tubes prétraités à l'acide nitrique. Faire un trait sur le tube B1 pour indiquer la quantité minimale de sang ombilical nécessaire (10 ml). Mettre le flacon prétraité dans un sachet en plastique refermable.

La solution d'acide peut être réutilisée jusqu'à un mois après sa préparation. Toutes les procédures doivent être réalisées dans une hotte de laboratoire en portant un équipement de protection individuelle adapté.

Pour détecter la présence d'agents contaminants, après le nettoyage, sélectionner 5 % des tubes au hasard et les analyser pour vérifier s'ils ont été contaminés au mercure. Pour ce faire, remplir les tubes d'eau purifiée et les secouer pendant 10 minutes. Analyser un aliquot pour y détecter les biomarqueurs en question (teneur totale en mercure).

## 1.5. Procédure de prélèvement

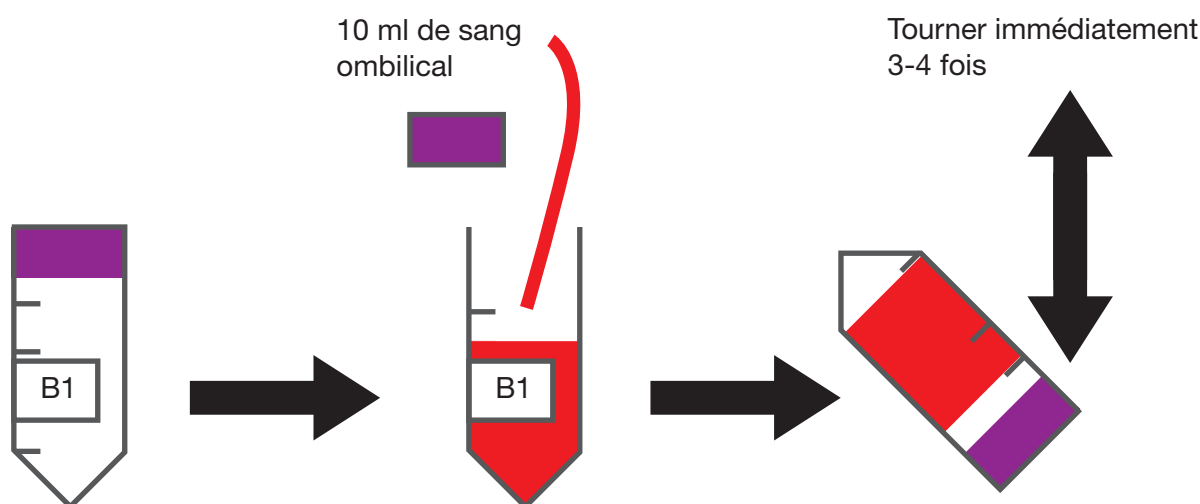
La procédure de prélèvement de sang ombilical (*ex utero*) se déroule comme suit.

1. Après le clamage du cordon ombilical et la séparation du nourrisson et du placenta, essuyer le cordon ombilical à l'aide d'une gaze imbibée d'alcool ou d'un liquide antiseptique à base d'iode pendant au moins 30 secondes sur le site de la ponction veineuse (veine) pour enlever le sang maternel. La stérilisation du cordon sur le site de la ponction est très importante car elle empêche toute contamination du sang ombilical.
2. Laisser sécher le site de la ponction veineuse.
3. Retirer les capuchons des aiguilles et les garder à proximité ; ils devront être replacés à la fin de la procédure de prélèvement.
4. Ponctionner la veine du cordon ombilical sur le site stérilisé et laisser le sang s'écouler dans la seringue.
5. Lorsque la seringue est pleine, prendre une aiguille plus étroite et l'insérer dans le bouchon Vacutainer pour que le sang s'écoule dans le tube.
6. Si le sang ne s'écoule plus, stériliser un autre site plus proche du placenta et utiliser une deuxième aiguille pour poursuivre le prélèvement de sang.
7. À la fin du prélèvement, remettre les capuchons sur les aiguilles pour éviter tout accident.
8. Attendre 10 minutes après le prélèvement. Ensuite, retourner délicatement le tube pour bien mélanger l'échantillon de sang.

L'échantillon de sang ombilical doit être prélevé et étiqueté comme suit (cf. Figure 1).

1. Prélever le sang ombilical dans le tube B1 (au moins 10 ml).
2. Tube B1 : retourner trois à quatre fois pour que le sang se mélange à l'EDTA.
3. Mettre le tube B1 dans le sachet refermable et l'emmener au laboratoire.
4. Remplir le formulaire de prélèvement (cf. Annexe 1).

Figure 1. Prélèvement du sang ombilical



Saisir les informations relatives au participant sur le formulaire d'enregistrement (cf. Annexe 2). Les données suivantes doivent être renseignées :

- nom du participant
- code d'identité (ID) de l'échantillon
- date et heure de la naissance
- heures de début et de fin du prélèvement de sang ombilical
- volume de sang ombilical prélevé

Le formulaire doit être transmis au centre de coordination ou au coordinateur de l'étude.

## 1.6. Étiquetage

Le sachet en plastique, les questionnaires et tous les tubes de prélèvement doivent porter une étiquette indiquant le code d'identification du participant.

## 1.7. Transport et conservation de l'échantillon

Les échantillons doivent être envoyés au laboratoire de l'hôpital local ou dans un autre lieu de stockage spécial dans l'hôpital dans les deux heures suivant le prélèvement. Les échantillons doivent être conservés dans un réfrigérateur ou dans une glacière pendant le transport, à moins de 4°C.

## 1.8. Réception des échantillons

Les critères d'acceptation ou de rejet d'un échantillon doivent être définis à l'avance et appliqués durant la phase de réception de l'échantillon. Ces critères doivent porter sur les conditions de transport, la documentation jointe, l'intégrité de l'emballage, la bonne identification des échantillons, et la quantité (qui doit être suffisante pour permettre leur analyse et leur dépôt dans des biobanques aux fins d'autres recherches).

Les points suivants doivent être contrôlés au moment de la réception des échantillons de sang ombilical.

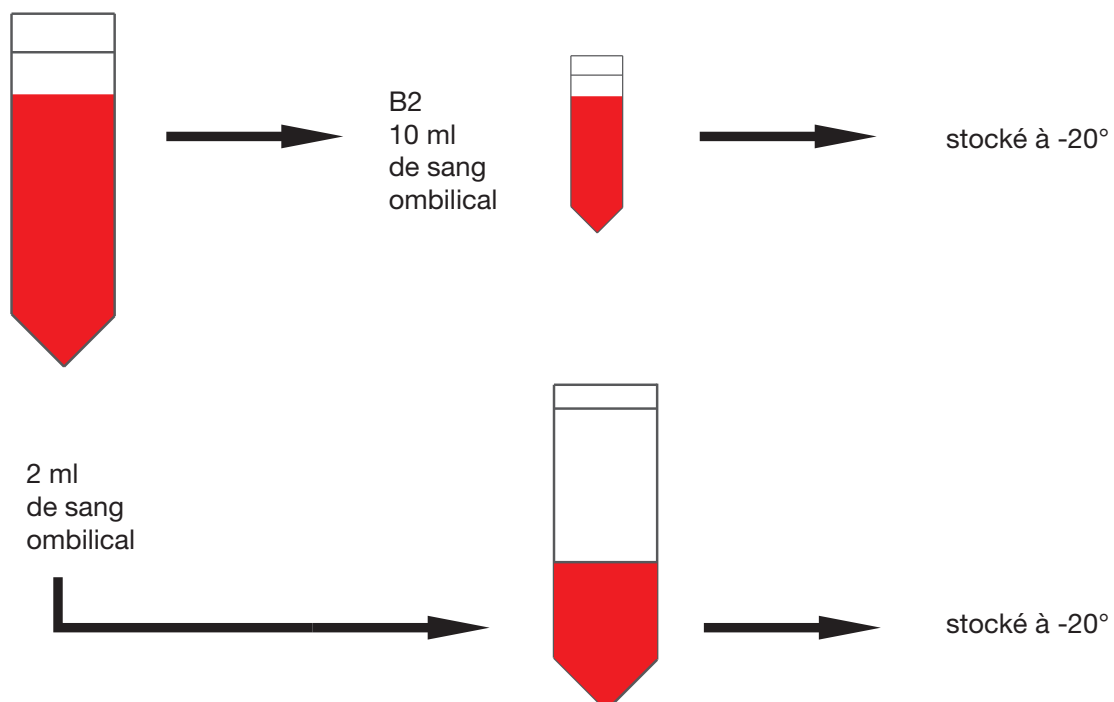
- Quantité et qualité des échantillons : pour être acceptable, l'échantillon doit avoir un faible volume (< 0,25 ml).
- Contamination soupçonnée : en raison d'une procédure ou de dispositifs de prélèvement inadaptés.
- Intégrité de l'emballage : les lots doivent être correctement fermés et ne peuvent pas avoir été manipulés (remarque : un scellé de sécurité peut être posé sur l'emballage sur le site de prélèvement).
- Pièces justificatives : tous les échantillons répertoriés dans le registre des échantillons prélevés doivent figurer dans l'emballage ; ils doivent être accompagnés des documents correspondants (questionnaires, etc.).
- Validité de l'identification : les échantillons et les documents reçus doivent être correctement identifiés avec les codes ID correspondants.

## 1.9. Aliquotage et préparation de l'échantillon

L'aliquotage peut être réalisé dans un laboratoire d'hôpital, dans un environnement exempt de mercure. Le laboratoire de l'hôpital doit préalablement préparer des boîtes de tubes d'aliquotage étiquetés. La quantité optimale d'échantillon pour l'évaluation du taux de mercure est de 1-2 ml (le minimum est 0,5 ml). S'il faut stocker de plus grandes quantités, il est recommandé de conserver des aliquots de 1-2 ml dans des fioles séparées plutôt que de stocker de plus grands volumes dans une seule fiole de prélèvement. La décongélation fréquente du sang peut entraîner des pertes de mercure.

La figure 2 illustre les processus d'aliquotage et de stockage. Dans le tube B2, un aliquot de 2 ml de sang ombilical est stocké à -20 °C aux fins de l'analyse du mercure. Un tube corning (B1) contenant le sang restant est stocké en vue d'une éventuelle double analyse du mercure à un stade ultérieur, ou d'une analyse d'autres polluants (si les échantillons doivent être stockés aux fins d'autres recherches).

Figure 2. Aliquotage et stockage de l'échantillon



## 1.10. Stockage et conservation

Tous les échantillons aliquotés doivent être stockés dans un congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'au moment de l'analyse. Il a été démontré que les échantillons restaient stables pendant plusieurs mois à  $-20^{\circ}\text{C}$ , et pendant plusieurs années à  $-70^{\circ}\text{C}$ .

## 1.11. Contrôle de la qualité : traçabilité

Il est essentiel d'assurer la traçabilité de l'échantillon tout au long de l'étude, donc celle-ci doit être garantie. L'échantillon de sang ombilical doit porter une étiquette indiquant le code ID. Comme indiqué précédemment, il est essentiel d'étiqueter correctement les échantillons et les documents connexes, mais il est aussi nécessaire de pouvoir relier l'échantillon aux informations fournies par le volontaire. À cette fin, tous les documents concernant les échantillons (questionnaires, registres, etc.) doivent être étiquetés avec le code ID de l'échantillon immédiatement après création.

# 2. Dosage du mercure dans le sang ombilical

L'analyse du dosage du mercure dans le sang ombilical doit se faire au moyen de méthodes d'analyse sensibles dans de bonnes conditions de contrôle de la qualité. Il existe de nombreuses méthodes d'analyse du taux total de mercure dans le sang humain, et certaines sont automatisées. En principe, il existe deux approches : (1) les méthodes basées sur la digestion acide suivie d'une spectrométrie d'absorption atomique de vapeur froide (SAAVF), d'une spectroscopie de fluorescence atomique de vapeur froide (SFAVF) et/ou d'une spectroscopie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) ; et (2) les méthodes basées sur la décomposition thermique et la SAAVF. La méthode décrite dans cette procédure opératoire standardisée se fonde sur le second principe alliant combustion, amalgamation du mercure avec l'or et détection par spectrométrie d'absorption atomique. Elle permet de déterminer de manière fiable et précise le dosage du mercure dans les échantillons de sang pour les concentrations typiques entraînées par une exposition environnementale et professionnelle. Un instrument spécifique (décrit plus loin dans la procédure) doit être fourni pour réaliser ces mesures. Si cet instrument n'est pas disponible, les laboratoires peuvent utiliser une procédure décrite dans la procédure opératoire standardisée pour évaluer le dosage du mercure dans l'urine ou un autre élément similaire (15).

Beaucoup de laboratoires utilisent également une technique proposée dans les directives préparées par le *National Institute for Minamata Disease* (Japon) (15). Cette méthode est proposée dans la procédure opératoire standardisée pour l'évaluation de la teneur totale en mercure de l'urine et peut aussi être utilisée avec du sang. La méthode est simple, sensible, efficace, et surtout, peu coûteuse, étant donné qu'elle ne nécessite qu'un équipement simple et de l'air atmosphérique comme gaz vecteur.

La méthode décrite dans cette procédure ne nécessite pas de prétraitement ou d'extraction des échantillons, génère peu de déchets chimiques et entraîne peu de risques de contamination.

Si les laboratoires utilisent d'autres équipements pour détecter la présence de mercure dans des échantillons traités par digestion acide, il est conseillé de suivre les instructions fournies par le fabricant du matériel. Les instructions relatives au prélèvement et à la manipulation des échantillons

fournies dans cette procédure opératoire standardisée sont adaptées quel que soit le matériel utilisé pour la détection du mercure. Il faut toutefois s'assurer que la limite de détection et la limite de quantification peuvent également s'appliquer aux échantillons de sang.

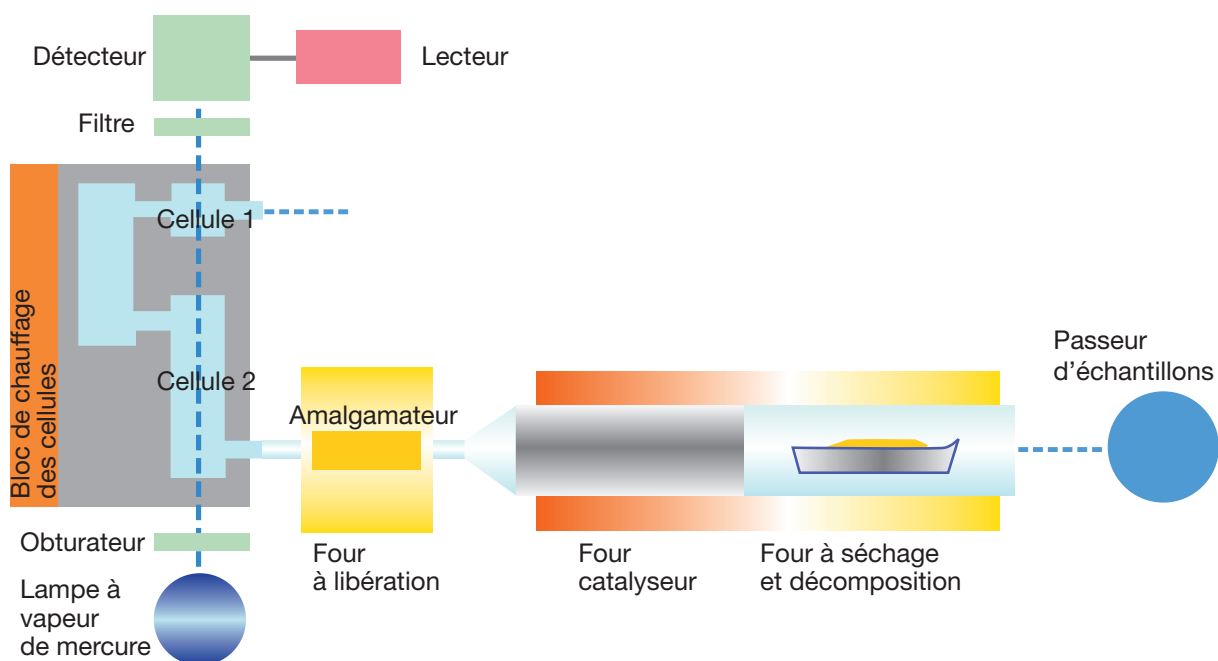
## 2.1. Portée de la méthode

La méthode décrite dans cette procédure opératoire standardisée est destinée à l'évaluation de la teneur totale en mercure du sang ombilical entier. La limite de quantification est de 0,2 ng/ml pour un échantillon de 200 mg. La teneur totale en mercure dans le sang ombilical chez les personnes qui ne consomment pas de poisson se situent généralement entre 0,5 ng/ml et 5,0 ng/ml. Des valeurs supérieures à 10 ng/ml sont fréquentes en cas de consommation plus élevée. La méthode décrite dans cette procédure opératoire standardisée peut s'appliquer à toutes les fourchettes constatées habituellement.

## 2.2. Principe technique

Dans cette procédure opératoire standardisée, le mercure dans le sang est quantifié par décomposition thermique, amalgamation avec l'or et spectrométrie d'absorption atomique, une technique d'analyse très sensible et sélective qui convient parfaitement aux analyses des éléments à l'état de traces. Les échantillons de sang sont pesés et introduits dans la nacelle sans aucun traitement préalable. L'échantillon est ensuite introduit dans l'analyseur de mercure direct (cf. Figure 3), où il est d'abord séché puis décomposé thermiquement avec un flux continu d'oxygène. Les produits de combustion sont transportés puis décomposés à nouveau au-dessus d'un catalyseur chaud. Les vapeurs de mercure sont emprisonnées dans un amalgamateur puis chauffées, ce qui a pour effet de libérer toutes les vapeurs de mercure dans la cellule d'absorption du spectrophotomètre d'absorption atomique. Le taux de mercure est déterminé par spectrométrie d'absorption atomique à 253,7 nm.

Figure 3. Analyseur de mercure direct



Hg = mercure.

Remarque : la version standard du Milestone DMA-80 (illustré ici) est équipée de deux cellules de mesure, d'une lampe de mercure et d'un détecteur de mercure.

Source : Milestone (13).

L'évaluation quantitative de la teneur en mercure se fait sur la base d'une courbe d'étalonnage obtenue à l'aide de solutions étalons de mercure. L'analyseur de mercure direct peut être configuré de différentes manières en fonction du type de modèle utilisé. Une cellule de mesure dont la plage de fonctionnement va de 0 à 20 ng de mercure (plage faible) a été utilisée pour réaliser la procédure décrite ici.

## 2.3. Précautions nécessaires

Il convient de prendre les précautions suivantes lors de l'analyse du dosage du mercure dans le sang ombilical.

- Placer les éléments jetables en plastique, en verre et en papier (embouts de pipette, tubes d'échantillonnage, gants, etc.) ayant été en contact avec des liquides biologiques humains, tels que le sang, dans un sac à autoclave pour déchets à risque biologique. Conserver ces sacs dans des flacons adaptés jusqu'à ce qu'ils soient fermés et autoclavés.
- Porter des gants, une blouse de laboratoire et des lunettes de protection pour manipuler toutes les solutions.
- Il convient de faire très attention à l'acide chlorhydrique concentré car c'est un produit chimique très dangereux pour les yeux et la peau.
- Les dangers possibles liés à l'utilisation du matériel sont l'exposition à des rayonnements ultraviolets, à des tensions élevées et à de fortes températures.
- Une fois le travail terminé, il convient de frotter toutes les surfaces de travail sur lesquelles a été effectuée la manipulation des liquides biologiques avec une solution d'hypochlorite de sodium à 10 % ou équivalent. Les échantillons biologiques et les échantillons dilués doivent être jetés dans un sac à autoclave pour déchets à risque biologique à la fin de l'analyse, conformément aux directives relatives à l'élimination des déchets dangereux.

## 2.4. Équipement, matériel et solutions

### 2.4.1. Équipement

L'analyse du dosage du mercure dans le sang ombilical nécessite l'équipement suivant :

- analyseur de mercure direct (par ex., Milestone DMA-80).

### 2.4.2. Matériel

L'analyse du dosage du mercure dans le sang ombilical nécessite le matériel suivant :

- balance de précision (lecture : 0,1 mg)
- pipette microlitre pour 100  $\mu$ l
- pipette microlitre, réglable entre 20  $\mu$ l et 200  $\mu$ l
- pipette microlitre, réglable entre 100  $\mu$ l et 1000  $\mu$ l
- tube pour aliquots d'échantillons sanguins – Cryovial ; 2 ml
- agitateur vortex de laboratoire
- nacelles en quartz (1,5 ml)
- convoyeur de bacs d'échantillons
- gants sans talc

### 2.4.3. Réactifs, produits chimiques et gaz

Le dosage du mercure du sang ombilical nécessite les réactifs, produits chimiques et les gaz suivants :

- oxygène gazeux (pur à 99,995 %)
- éthanol à 70 % (pour analyse)
- acide chlorhydrique à 37 % (pour analyse)
- eau purifiée (eau bidistillée)

### 2.4.4 Solutions étalons

#### Solution étalon mère

Pour préparer une solution étalon primaire de mercure (solution mère) avec une concentration de 1 mg/ml, mettre 0,2500 g de mercure liquide élémentaire ( $Hg^0$ ) dans une fiole en Pyrex de 250 ml. Ajouter 2 ml d'acide nitrique qui sera dilué avec de l'eau bidistillée pour obtenir 250 ml. La solution doit être conservée au réfrigérateur.

#### Solution étalon intermédiaire

Pour préparer une solution étalon intermédiaire de mercure avec une concentration de 5  $\mu g/ml$ , procéder à une dilution appropriée d'acide nitrique à 5 % dans de l'eau bidistillée. Il est préférable de préparer les étalons dans des fioles en verre et de les conserver au réfrigérateur pour qu'elles restent stables pendant un an. Les solutions étalons intermédiaires doivent arriver à température ambiante avant qu'il ne soit procédé à la dilution des solutions étalons de travail.

#### Solutions étalons de travail

Pour préparer des solutions étalons de travail de mercure à deux concentrations différentes (2 ng/ml et 10 ng/ml), procéder à une dilution appropriée dans de l'acide chlorhydrique à 5 %. Il est recommandé de les conserver dans des fioles en verre (le Téflon convient également). Les solutions étalons de travail doivent être conservées au réfrigérateur lorsqu'elles ne sont pas utilisées. Il convient de les sortir du réfrigérateur environ deux heures avant utilisation pour leur permettre d'arriver à température ambiante. Les solutions étalons de travail se préparent toutes les semaines, mais les utilisateurs sont invités à vérifier la stabilité dans leurs conditions de laboratoire.

### 2.4.5 Matériaux de référence

Il convient d'utiliser des matériaux de référence certifiés pour le dosage du mercure dans le sang. Du Seronorm Trace Elements Whole Blood L-1, avec une valeur de référence de 2,2 ng/g (2,0-2,4 ng/g), a par exemple été utilisé pour procéder à la validation et au contrôle normal de la qualité de cette procédure opératoire standardisée. Le tableau 1 reprend d'autres types de matériaux de référence disponibles aux fins du dosage du mercure dans le sang humain.

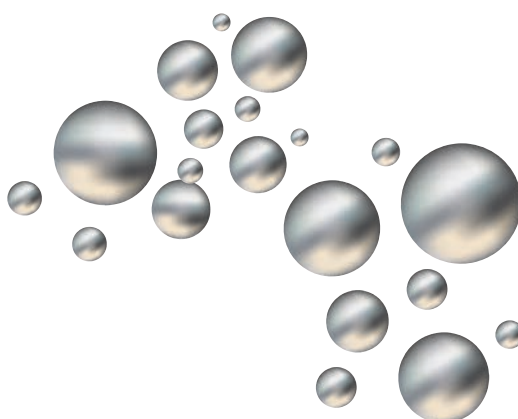




Tableau 1. Matériaux de référence pour le dosage du mercure dans le sang

Matériau de référence	Valeurs de référence (ng/ml)
SRM 955c Lead in Caprine Blood, de NIST	17,8 ± 1,6
SRM 966 Toxic Metals in Blood, de NIST	31,4 ± 1,7
Seronorm™ Trace Elements Whole Blood L-1, art. 210105	1,97 ± 0,2
Seronorm™ Trace Elements Whole Blood L-2, art. 210205	15,2 ± 1,6
Seronorm™ Trace Elements Whole Blood L-3, art. 210305	31,4 ± 3,4

Remarque : de nouveaux matériaux de référence sont continuellement produits pour remplacer les produits obsolètes. Les utilisateurs sont donc invités à vérifier régulièrement si des matériaux de référence appropriés sont disponibles.

## 2.5. Étalonnage

L'étalonnage se fait au moyen des solutions étalons de travail décrites au point 2.4.4.

Pipetter un volume connu d'étalon de façon à couvrir la bonne plage de mesure. Il faut normalement couvrir une plage allant de 0 à 20 ng (les quantités généralement couvertes sont 0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,5 ; 1,0 ; 2,0 ; 5,0 et 10,0 ng). Le volume de l'étalon ne doit pas dépasser 0,2 ml. La nouvelle courbe d'étalonnage se fait toutes les semaines, voire moins souvent, car les étalonnages sont très stables. Le logiciel de l'instrument permet de procéder à des lectures automatisées à partir de graphiques d'étalonnage enregistrés dans le système. Il convient cependant d'utiliser tous les jours des étalons de travail couvrant la plage de concentrations de mercure de l'échantillon (généralement 0,2 ; 1,0 ; et 10,0 ng) afin de vérifier si les courbes d'étalonnage enregistrées dans le système sont correctes.

Il est indispensable de s'assurer que la courbe d'étalonnage est correcte au début de la série de mesures. Utiliser des solutions étalons de 2 et 10 ng/ml. Si les étalons de mercure sont en dehors de la plage requise, il faut répéter la courbe d'étalonnage.

## 2.6. Procédure

### 2.6.1. Préparation de l'équipement pour l'analyse

#### Données techniques

Les données techniques du matériel d'analyse sont les suivantes :

- principe : spectrométrie d'absorption atomique ;
- système de détection du mercure : spectrophotomètre à un faisceau avec flux séquentiel par deux cellules de mesure ;
- source de lumière : lampe à vapeur de mercure à faible pression ;
- longueur d'onde : 253,65 nm ;
- filtre interférentiel : 254 nm, bande passante de 9 nm ;
- détecteur : photodétecteur d'ultraviolets en silicone ;
- plages de fonctionnement :
  - plage basse : 0-7,5 ng (limite d'absorption de la cellule 1 : 0,45) ;
  - limite de détection : 0,005 ng ;

- échantillonneur automatique : intégré, 40 positions ;
- gaz vecteur : oxygène, admission du gaz 4 bar (60 psi), débit d'environ 200 ml/min.

Les données techniques décrites ci-dessus ont été établies pendant la configuration de l'instrument utilisé pour cette analyse.

### Étape 1. Préparation de l'analyseur de mercure direct

Les manipulations suivantes doivent être réalisées selon les instructions du manuel de l'utilisateur : ouverture de l'alimentation en oxygène, démarrage de l'analyseur de mercure direct et création d'un fichier de données.

### Étape 2. Nettoyage du système

Le système doit être nettoyé avant toute prise de mesures. Commencer par pipetter le nettoyant dans deux nacelles en quartz, puis dans l'emplacement vide. Mesurer un emplacement vide à l'aide du programme approprié. Un optimum est proposé ci-après, mais il est recommandé aux utilisateurs de vérifier dans leur propre configuration :

- temps de séchage : 0 s (prolongé de 60 secondes lorsqu'un nettoyant est utilisé)
- température de séchage : 200°C
- temps de décomposition : 150 s
- température de décomposition : 650°C
- temps de purge : 60 s

### Étape 3. Vérification du système de fond

Il convient d'analyser trois nacelles de combustion en quartz vides au moyen de la méthode décrite ci-dessus pour s'assurer que l'absorption (mesurée en fonction de la hauteur du pic) des échantillons finaux est inférieure à 0,0030. Le laboratoire doit se fonder sur les instructions du fabricant pour déterminer si le mouvement propre du système est acceptable. Si l'absorption dépasse 0,0030, il faut analyser d'autres nacelles de combustion en quartz jusqu'à obtenir la valeur cible. Si le niveau de mouvement propre souhaité n'est pas obtenu après l'analyse de cinq nacelles de combustion en quartz, il convient de nettoyer le système en analysant une solution de nettoyant dans une nacelle de combustion en quartz, puis en suivant la procédure décrite ci-dessus.

### Étape 4. Contrôle de la solution étalon de travail

Mesurer deux sous-échantillons de chaque solution étalon (2 ng/ml et 10 ng/ml) contenant environ 0,2 ng et 1 ng de mercure (100 µl de solution étalon de travail) pour vérifier la cellule 1 (plage faible). La solution étalon de mercure se mesure comme suit :

- température de séchage : 200°C
- temps de séchage : 60 s
- température de décomposition : 650°C
- temps de décomposition : 150 s
- temps de purge : 60 s.

Comparer la concentration obtenue pour la solution étalon de travail de mercure à la concentration déterminée par la courbe d'étalonnage. Si la valeur ciblée présente un écart de plus de 10 %, répéter la mesure jusqu'à obtenir une valeur appartenant à la plage recherchée. Préparer une nouvelle solution étalon si la valeur visée n'est pas obtenue après cinq tentatives. Si celle-ci ne produit toujours pas la valeur souhaitée, préparer de nouvelles solutions étalons de travail pour réétalonner le système.

## Étape 5. Contrôle de la qualité préalable à la mesure

Mesurer deux échantillons de matériau de référence certifié (par ex., Seronorm Whole Blood L-1) contenant environ 0,2 ng de mercure (environ 100 mg de matériau) pour vérifier la cellule 1 (plage faible). Le matériau de référence se mesure comme suit :

- température de séchage : 200°C
- temps de séchage : 120 s
- température de décomposition : 650°C
- temps de décomposition : 180 s
- temps de purge : 60 s.

La concentration déterminée pour l'échantillon de matériau de référence doit se trouver dans la plage d'incertitude de la valeur certifiée. Si ce n'est pas le cas, répéter la mesure jusqu'à obtenir une valeur appartenant à cette fourchette. Réétalonner le système si la valeur visée n'est pas obtenue après cinq tentatives.

Une fois que ces cinq étapes ont bien été réalisées, l'analyseur de mercure direct est prêt pour l'analyse des échantillons.

### 2.6.2. Détermination analytique

#### Pesée des échantillons

Les nacelles de combustion et le support utilisé pour peser les échantillons sanguins doivent être manipulés à l'aide d'une pince.

Mettre le support de la nacelle de combustion sur la balance. Mettre une nacelle de combustion en quartz au-dessus du support et régler la balance à zéro.

Ouvrir la fiole contenant l'échantillon, ajouter environ 200 µl de sang dans la nacelle de combustion et peser l'échantillon. Mettre la nacelle de combustion contenant l'échantillon sur le bac d'échantillons et noter le code, le poids et l'emplacement de l'échantillon dans le registre de pesée. Préparer deux réplicats pour chaque échantillon. Il est nécessaire de mesurer un échantillon à blanc après chaque échantillon. Utiliser des embouts de pipette spéciaux à filtre pour chaque échantillon différent.

#### Analyse de l'échantillon

Mettre les nacelles de combustion en quartz contenant les échantillons et les contrôles de la qualité dans l'autoéchantillonneur de l'analyseur de mercure direct dans l'ordre dans lequel ils ont été pesés.

Programmer ensuite les échantillons en saisissant leur code et leur poids, puis en sélectionnant la méthode. Les paramètres de la méthode sont les suivants :

- température de séchage : 200°C
- temps de séchage : 200 s
- température de décomposition : 650°C
- temps de décomposition : 180 s
- temps de purge : 60 s

**Remarque.** Les paramètres d'orientation doivent être réglés pour chaque instrument selon les instructions du fabricant.

Voici un exemple de séquences d'échantillons :

- nettoyant

- nettoyant
- blanc (8 x)
- étalon de travail 2 ng/ml
- étalon de travail 2 ng/ml
- blanc
- étalon de travail 10 ng/ml
- étalon de travail 10 ng/ml
- blanc
- matériau de référence
- matériau de référence
- blanc
- blanc
- échantillon 1
- échantillon 1
- blanc
- échantillon 2
- échantillon 2
- blanc
- étalon de travail 2 ng/ml
- étalon de travail 10 ng/ml
- blanc
- échantillon 5
- échantillon 5
- blanc
- échantillon 8
- échantillon 8
- étalon de travail 2 ng/ml
- étalon de travail 10 ng/ml
- blanc

### 2.6.3. Calcul des résultats analytiques

L'équipement affiche directement les données sous forme de nanogrammes de mercure par gramme de sang par interpolation de la mesure de la courbe d'étalonnage.

La valeur finale affichée correspond à la moyenne de deux mesures différentes. Si les valeurs présentent un écart supérieur à 10 %, il convient de mesurer à nouveau l'échantillon. Les valeurs moyennes de deux résultats similaires s'afficheront.

### 2.6.4. Plage de résultats mesurables

Les valeurs de mercure sont mesurables lorsque les résultats sont obtenus dans une plage définie par une courbe d'étalonnage. Si la quantité de mercure obtenue dans l'échantillon se trouve en dehors de cette plage, il convient de tester à nouveau l'échantillon selon la procédure suivante.

- Si la valeur est inférieure à la concentration de mercure la plus faible de l'étalonnage, prélever la quantité nécessaire de sang pour deux nouveaux réplicats afin d'obtenir un nouveau résultat qui se situe dans la plage d'étalonnage. La quantité maximale de sang prélevé pour l'analyse ne doit pas dépasser 250 mg.
- Si la valeur dépasse le point d'étalonnage le plus élevé, prélever de plus petites quantités d'échantillon pour obtenir des résultats dans la plage d'étalonnage.

## 2.7. Contrôle de la qualité

La précision et l'exactitude des analyses de biomarqueurs effectuées par les laboratoires doivent être constamment vérifiées au moyen de mesures d'assurance de la qualité.

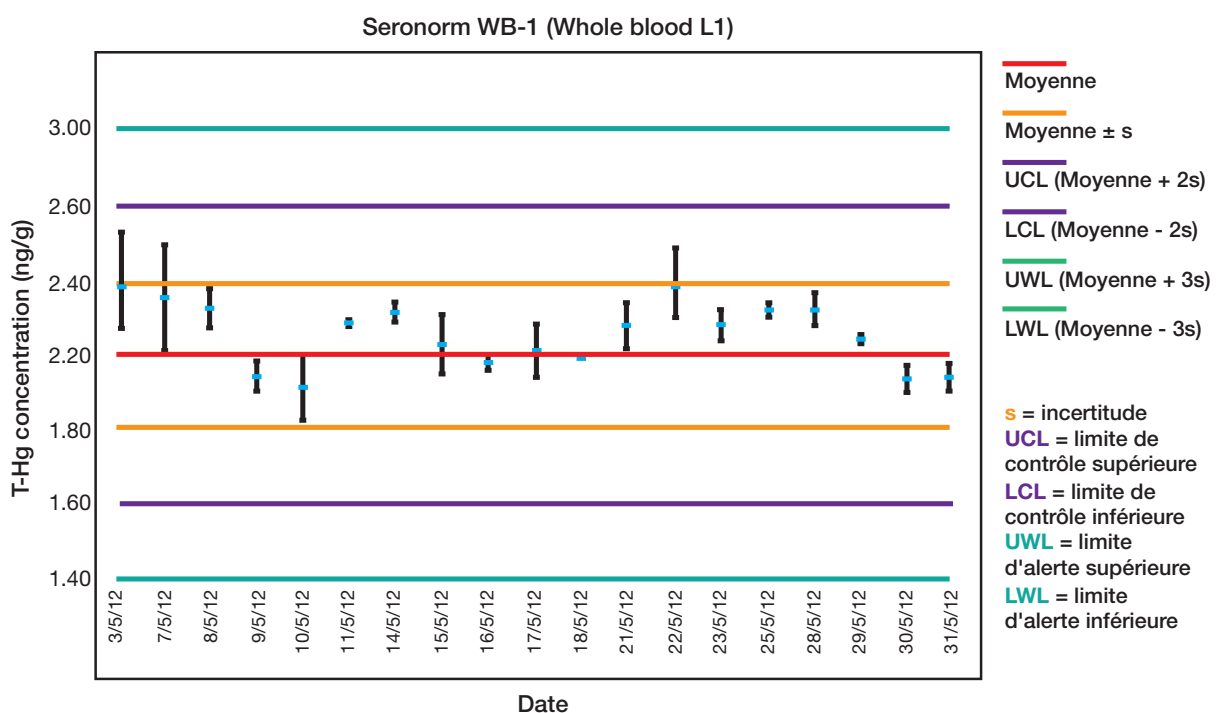
En général, l'assurance qualité dans les laboratoires s'articule autour de contrôles interne et externe de la qualité (voir également le *Programme de contrôle de la qualité pour la biosurveillance humaine du mercure*), tels que décrits ci-après.

- Le contrôle interne de la qualité est un ensemble de procédures suivies par le personnel d'un laboratoire pour évaluer constamment les résultats à mesure qu'ils apparaissent afin de s'assurer qu'ils sont suffisamment fiables pour être diffusés.
- Le contrôle externe de la qualité est un système qui permet de vérifier objectivement la performance d'un laboratoire au moyen d'un système de contrôle externe de la qualité. Ce contrôle peut être réalisé à l'occasion de comparaisons inter-laboratoires adaptées, si celles-ci existent.

Dans cette procédure opératoire standardisée, du matériel de contrôle de la qualité est utilisé pour évaluer la précision et l'exactitude. La figure 4 présente un exemple de tableau de contrôle de la qualité concernant les matériaux de référence pour le sang. Du Seronorm Whole Blood L-1 ( $2,2 \pm 0,2$  ng/ml) a été utilisé pour procéder au contrôle de la qualité dans la cadre de cette procédure.

Il est recommandé aux laboratoires de contrôler soigneusement et régulièrement l'efficacité de la méthode analytique, comme décrit dans la norme 17 025:2005 de l'Organisation internationale de normalisation/Commission électrotechnique internationale (ISO/IEC) (17).

Figure 4. Exemple de tableau de contrôle de la qualité



T-Hg = teneur totale en mercure.

## 2.8. Évaluation de la méthode

Chaque laboratoire doit appliquer la norme ISO/IEC 17025:2005 intitulée *Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais* (17). La méthode doit être validée selon ses critères de performance (sensibilité, linéarité, récupération, fiabilité, précision, exactitude, limite de détection, etc.) et s'accompagner d'une estimation de l'incertitude de mesure, puisque cette dernière est une propriété fondamentale de tout résultat et fait partie des exigences de la norme ISO/IEC 17025:2005. Il est recommandé de consulter les guides en libre accès d'EURACHEM (18), en particulier ceux qui portent sur les protocoles de validation et l'évaluation de l'incertitude. Le mercure peut être présent dans le sang en très faible quantité. Afin de pouvoir mesurer la concentration chez la population générale, la limite de quantification ne doit pas dépasser 0,1 ng/ml. Il est vivement conseillé à ceux qui utilisent la méthodologie décrite dans cette procédure opératoire standardisée de respecter le glossaire disponible dans *Terminology in analytical measurement: Introduction to VIM 3* (19).

Les critères de performance et l'estimation de l'incertitude de mesure applicables à la méthode décrite dans cette procédure opératoire standardisée sont présentés ci-dessous.

### 2.8.1. Limites de détection et de quantification

La limite de quantification a été déterminée à partir du point le plus faible de la courbe d'étalonnage, soit 0,05 ng. En tenant compte de la masse d'un échantillon mesuré (0,2 g), la limite de quantification était de 0,25 ng/g.

La limite de détection a été déterminée comme étant la limite de quantification/3, soit 0,8 ng/g.

### 2.8.2. Précision

L'analyse régulière d'échantillons de sang ombilical sur une plus longue période (par ex., un an) permet de mesurer le degré de reproductibilité de la méthode analytique décrite. Les résultats d'une série de mesures ( $n = 15$ ) du dosage en mercure du sang ombilical sont présentés dans le tableau 2 à titre d'exemple. Deux réplicats de chaque échantillon ont été analysés.

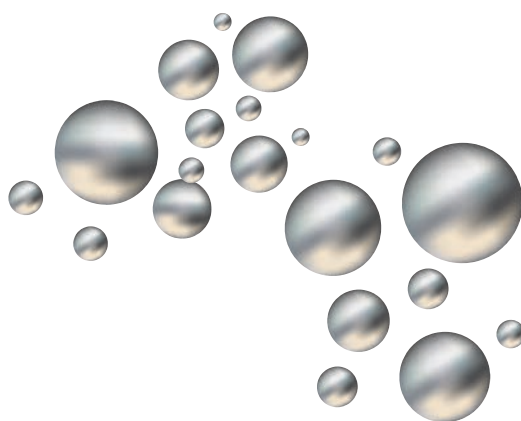


Tableau 2. Résultats du double dosage du mercure total dans des échantillons de sang ombilical et écarts relatifs

Échantillon	Résultat D1 (ng/g)	Résultat D2 (ng/g)	Valeur moyenne (D1+D2)/2	Écart D1-D2)	Écart relatif (D1-D2)/médiane
Sang ombilical 1	0,87	0,86	0,87	0,01	0,012
Sang ombilical 2	3,24	3,25	3,25	-0,01	-0,003
Sang ombilical 3	5,45	5,68	5,57	-0,23	-0,041
Sang ombilical 4	1,22	1,22	1,22	0,00	0,000
Sang ombilical 5	1,28	1,40	1,34	-0,12	-0,090
Sang ombilical 6	4,67	4,55	4,61	0,12	0,026
Sang ombilical 7	1,34	1,32	1,33	0,02	0,015
Sang ombilical 8	2,92	2,92	2,92	0,00	0,000
Sang ombilical 9	1,16	1,21	1,19	-0,05	-0,042
Sang ombilical 10	1,85	1,58	1,72	0,27	0,157
Sang ombilical 11	3,67	3,73	3,70	-0,06	-0,016
Sang ombilical 12	1,42	1,36	1,39	0,06	0,043
Sang ombilical 13	2,83	2,81	2,82	0,02	0,007
Sang ombilical 14	1,94	1,98	2,00	-0,04	-0,020
Sang ombilical 15	1,19	1,24	1,22	-0,05	-0,041

D1 = mesure 1 ; D2 = mesure 2.

Afin d'évaluer la reproductibilité ou la répétabilité, on calcule l'écart-type de la double analyse à l'aide de l'équation suivante.

$$RSD_d = \frac{s_d}{\sqrt{n}}$$

RSDd = RSDd – écart type relatif des mesures des répliqués

Sd– écart-type des écarts relatifs ((D1-D2)/moyenne)

n – nombre de répliqués (n = 2)

La répétabilité obtenue pour cet ensemble de mesures s'élevait à 3,9 %.

### 2.8.3. Justesse des résultats

La justesse de nos résultats a été estimée à l'aide du matériau de référence Seronorm WB-1 (Whole Blood L1). Afin de mesurer la justesse de nos résultats, nous avons calculé la récupération ( $R$ ) à partir des mesures du matériau de référence effectuées sur une période d'un mois. Les niveaux observés ont été comparés à la valeur de référence à l'aide de l'équation suivante.

$$R = \frac{\text{valeur observée}}{\text{valeur de référence}}$$

R – récupération

Un exemple des mesures de la teneur totale en mercure du matériau de référence est présenté dans le Tableau 3.

Tableau 3. Mesures de la teneur totale en mercure de Seronorm WB-1 (Whole blood L1)

Mesure	Valeur mesurée (ng/g)	Valeur réelle (ng/g)	Récupération (%)
Jour 1	2,39	2,2	109
Jour 2	2,35	2,2	107
Jour 3	2,32	2,2	105
Jour 4	2,14	2,2	97
Jour 5	2,11	2,2	96
Jour 6	2,28	2,2	104
Jour 7	2,31	2,2	105
Jour 8	2,23	2,2	101
Jour 9	2,17	2,2	99
Jour 10	2,21	2,2	100
Jour 11	2,19	2,2	99
Jour 12	2,27	2,2	103
Jour 13	2,39	2,2	109
Jour 14	2,28	2,2	104
Jour 15	2,32	2,2	105
Jour 16	2,32	2,2	105
Jour 17	2,24	2,2	102
Jour 18	2,13	2,2	97
Jour 19	2,14	2,2	97

Le taux de récupération calculé à partir des mesures fournies dans le tableau 3 s'élevait à 102 %.



### 2.8.4. Incertitude de mesure

L'incertitude de mesure pour la teneur totale en mercure dans le sang ombilical par désorption thermique et SAAVF a été estimée sur la base des *Lignes directrices relatives à l'utilisation d'estimations de la répétabilité, de la reproductibilité et de la justesse dans l'évaluation de l'incertitude de mesure* (ISO 21748:2010). Des données sur la reproductibilité (répétabilité) et la récupération issues de notre étude de validation ont été utilisées à cet effet.

L'incertitude de la répétabilité ( $u_{rep}$ ) s'élevait à 3,9 % (paragraphe 2.8.2), tandis que l'incertitude de la récupération ( $u[R_m]$  ou  $u_{rec}$ ) atteignait 1,7 % et a été calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$u(\bar{R}_m) = \bar{R}_m \times \sqrt{\frac{s_{obs}^2}{n \cdot \bar{C}_{obs}^2} + \frac{u(C_{ref})}{C_{ref}}^2}$$

$R_m$  – récupération

$s_{obs}$  – écart-type des données observées

$C_{obs}$  – valeur moyenne des données observées

$C_{ref}$  – valeur de référence

$u(C_{ref})$  – incertitude de la valeur de référence

La quatrième et dernière étape porte sur le calcul de l'incertitude combinée. Avant d'effectuer le regroupement, tous les facteurs d'incertitude doivent être exprimés sous forme d'incertitudes standard (écarts-types). L'incertitude combinée ( $u_c$ ) a été calculée à l'aide de l'équation suivante.

$$u_c = \sqrt{u_{rep}^2 + u_{rec}^2}$$

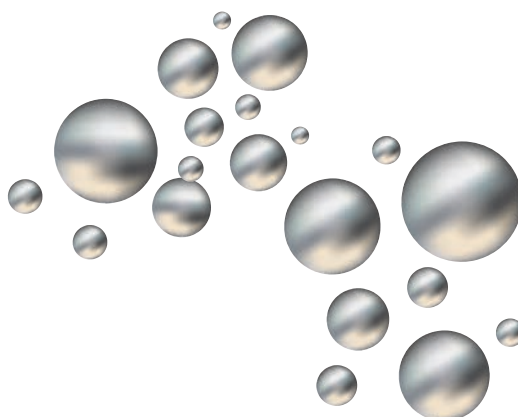
$u_c$  – incertitude combinée

$u_{rep}$  – erreur liée à la reproductibilité

$u_{rec}$  – erreur liée à la récupération

L'incertitude élargie ( $U$ ) a été exprimée en multipliant  $u_c$  par le facteur  $k$ . Le choix du facteur  $k$  dépend du niveau de confiance souhaité. Pour un niveau de confiance approximatif de 95 %,  $k$  doit être égal à 2.

L'incertitude de mesure estimée pour la détermination de la teneur totale en mercure dans le sang ombilical par décomposition thermique et SAAVF s'élève à 4,3 %, et l'incertitude élargie ( $k = 2$ ) à 8,4 %. Cette estimation est valable pour une fourchette d'exposition « normale » (moins de 5,8 ng/g).



### 3. Interprétation des résultats

La teneur en mercure dans le sang résulte d'une exposition par ingestion de poisson ou d'eau contaminés, par inhalation de vapeurs de mercure élémentaire présentes dans l'air ambiant et par l'intermédiaire d'amalgames dentaires ou de traitements médicaux. La présence de mercure dans le sang indique une exposition récente ou récurrente au mercure. Il existe un lien direct entre les concentrations de mercure dans le sang humain et la consommation de poisson contaminé par du méthylmercure. En général, la teneur en méthylmercure du sang atteint son niveau maximal dans les 4 heures à 14 heures, puis est éliminée du sang vers les autres tissus de l'organisme après 20 heures à 30 heures (6).

Lors de la phase initiale de l'analyse des données (statistiques descriptives), des valeurs statistiques de base sont calculées pour chaque biomarqueur : valeurs minimale et maximale, pourcentage de sujets chez qui la valeur du biomarqueur dépasse les limites de quantification ou de détection, et moyenne géométrique. Les valeurs du percentile, soit les valeurs d'une variable en dessous de laquelle tombe un certain pourcentage d'observations, peuvent également être calculées – valeurs du 50<sup>e</sup> percentile (P50 ; médiane), du 90<sup>e</sup> percentile (P90) et du 95<sup>e</sup> percentile (P95). Des pourcentages de résultats supérieurs aux valeurs de référence ou aux valeurs en rapport avec la santé peuvent aussi être signalés (20).

Les données de la biosurveillance humaine peuvent être interprétées en comparant les niveaux du biomarqueur aux valeurs de référence de la biosurveillance en rapport avec la santé. Dans ce contexte, la *German Human Biomonitoring Commission* a extrait des valeurs de référence pour plusieurs composés (21). Ces valeurs ont été déterminées sur la base des liens entre exposition et effets (par ex. pour le cadmium, le plomb, le mercure et le pentachlorophénol) ou déduites à partir des doses journalières tolérables (20).

Les moyennes géométriques de mercure dans le sang étaient inférieures ou environ égales à 1 µg/l dans la plupart des études en Europe. Cependant, dans certaines sous-populations, les taux d'exposition dépassaient la valeur de 5 µg/l basée sur des critères de santé (20).

L'OMS considère qu'une moyenne de 5 µg/l à 10 µg/l de concentration de mercure totale dans le sang constitue la norme chez les personnes qui ne consomment pas de poisson contaminé (6). Pour le *National Research Committee* des États-Unis, la concentration moyenne normale chez les personnes qui ne consomment pas de poison ou qui en consomment peu aux États-Unis est de 2 µg/l (22).

Estimation de l'exposition par biosurveillance des niveaux d'environ 5 µg/l à 6 µg/l dans le sang ombilical et des concentrations de mercure dans le sang d'environ 4 µg/l à 5 µg/l. Ce rapport est généralement directement proportionné.

Le tableau 4 présente des exemples de concentrations sanguines dans des populations de différentes provinces du Canada, issues d'une étude du Programme de surveillance et d'évaluation pour l'Arctique (AMAP) de 2003 (23).

Tableau 4. Résumé des données relatives aux niveaux de mercure et de méthylmercure dans le sang maternel au Canada

Pays / groupe ethnique / région	Nombre de personnes échantillonnées	Moyenne de mercure total (µg/L)	Plage de mercure total (µg/L)	Moyenne de méthylmercure (µg/L)	Plage de méthylmercure (µg/L)
Canada	134	0,9	nd-4,2	0,69	nd-3,6
Caucasien 1 (1994-1999)					
Métis/Déné (1994-1995)	92	1,4	nd-6,0	0,8	nd-4,0
Autre (1995)	13	1,3	0,2-3,4	1,2	nd-3,0
Baffin 1(1996)	31	6,7	nd-34	6,0	nd-29
Inuvik 1 (1998-1999)	31	2,1	0,6-24	1,8	nd-21
Kitikmeot 1 (1994-1995)	63	3,4	nd-13	2,9	nd-11
Kivalliq 1 (1996-1997)	17	3,7	0,6-12	2,7	0,4-9,7
Nunavik 2 (1995-2000)	162	9,8	1,6-44	sa	sa

nd = non détecté ; sa = sans objet

Source : AMAP 2003 (23).

Les rapports moyens entre l'apport (µg/kg par jour) et les taux dans le sang (µg/l) au sein d'une population, au fil du temps, sont censés être généralement uniformes. Le rapport quantitatif entre les niveaux de mercure dans le sang et les niveaux de mercure (en particulier de méthylmercure) d'une dose moyenne journalière (ou apport) est relativement bien compris.

Il est donc possible de procéder à des conversions de doses de ce type avec une assurance raisonnable à condition de disposer de suffisamment d'informations sur les différentes formes du mercure et d'autres facteurs. La variabilité de la population doit cependant être indiquée dans la conversion des doses (24). On estime par exemple qu'un apport moyen journalier de méthylmercure de 0,1 µg par kilogramme de poids (0,1 µg/kg par jour) chez une femme adulte génère un taux d'environ 5 µg/l à 6 µg/l dans le sang ombilical (24).



# Références

1. Mercure et santé [principaux repères], Genève, Organisation mondiale de la Santé, 2017 (<https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/mercury-and-health>, consulté le 16 juillet 2018).
2. Holmes P, James KA, Levy LS. Is low-level environmental mercury exposure of concern to human health? *Sci Total Environ.* 2009;408:171–82 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969709009061?via%3Dihub>, accessed 31 January 2018) .
3. Hong YS, Kim YM, Lee KE. Methylmercury exposure and health effects. *J Prev Med Public Health.* 2012;45(6):353–63 (<https://www.jpmp.org/journal/view.php?doi=10.3961/jpmp.2012.45.6.353>, accessed 31 January 2018) .
4. Woods JS, Martin MD, Leroux BG, DeRouen TA, Leitao JG, Bernardo MF et al. The contribution of dental amalgam to urinary mercury excretion in children. *Environ Health Perspect.* 2007;115:1527–31 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2022658/>, accessed 31 January 2018) .
5. Zeitz P, Orr MF, Kaye WE. Public health consequences of mercury spills: hazardous substances emergency events surveillance system, 1993–1998. *Environ Health Perspect.* 2002;110:129–3. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1240725/pdf/ehp0110-000129.pdf>, accessed 31 January 2018).
6. Methylmercury. *Environmental Health Criteria 101.* Geneva: World Health Organization and International Programme on Chemistry Safety; 1990 ([http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/38082/1/9241571012\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/38082/1/9241571012_eng.pdf), accessed 31 January 2018).
7. Guidance for identifying populations at risk from mercury exposure. Geneva: United Nations Environment Programme and World Health Organization; 2008 (<http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/mercuryexposure.pdf?ua=1>, accessed 31 January 2018) .
8. Mason HJ, Hindell P, Williams NR. Biological monitoring and exposure to mercury. *Occup Med.* 2001;51:2–11 ([https://www.researchgate.net/publication/12095723\\_Biological\\_monitoring\\_and\\_exposure\\_to\\_mercury](https://www.researchgate.net/publication/12095723_Biological_monitoring_and_exposure_to_mercury), accessed 31 January 2018).
9. Barregård L. Biological monitoring of exposure to mercury vapour. *Scand J Work Environ Health.* 1993;19(1):45–9 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/pubmed/8159972/>, accessed 31 January 2018).
10. Miklavčič A, Cuderman P, Mazej D, Snoj Tratnik J, Krsnik M, Planinšek P et al. Biomarkers of low-level mercury exposure through fish consumption in pregnant and lactating Slovenian women. *Environ Res.* 2011;111:1201–7 ([http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/\\_Public/41/131/41131311.pdf](http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/41/131/41131311.pdf), accessed 31 January 2018).
11. Gradjean P, Jørgensen PJ, Weihe P. Validity of mercury exposure biomarkers. In: Wilson SH, Suk WA, editors. *Biomarkers of environmentally associated disease.* Boca Raton: CRC Press; 2002:235–47.
12. Smolders R, Schramm K-W, Nickmilder M, Schoeters G. Applicability of non-invasively collected matrices for human biomonitoring. *Environ Health.* 2009;8:8 (<https://ehjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-069X-8-8>, accessed 31 January 2018).
13. Gradjean P, Budtz-Jørgensen E, Jørgensen PJ, Weihe P. Umbilical cord mercury concentration as a biomarker of prenatal exposure to methylmercury. *Environ Health Perspect.* 2005;113:905–8 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1257654/>, accessed 31 January 2018).

14. Miklavčič A, Casetta A, Snoj Tratnik J, Mazej D, Krsnik M, Mariuz M et al. Mercury, arsenic and selenium exposure levels in relation to fish consumption in the Mediterranean area. *Environ Res.* 2013;120:7–17 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001393511200268X?via%3Dihub>, accessed 31 January 2018).
15. Akagi H. Analytical methods for evaluating human exposure to mercury due to gold mining. In: *Proceedings of the International Workshop on Health and Environmental Effects of Mercury due to Mining Operations*, Manila, 26–27 November 1997. Minamata: National Institute for Minamata Disease;1998:131–41.
16. DMA 80. In: Milestone [website]. Sorisole: Milestone; 2018 <https://www.milestonesrl.com/en/mercury/dma-80/>, accessed 31 January 2018).
17. ISO/IEC 17025:2005 Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais, Genève, Organisation internationale de normalisation, 2005 (<https://www.iso.org/fr/standard/39883.html>, consulté le 31 janvier 2018).
18. Eurachem [website]. Olomouc: Eurachem; 2018 (<http://www.eurachem.org>, accessed 31 January 2018).
19. Barwick VJ, Prichard E, editors. *Eurachem Guide: Terminology in analytical measurement – Introduction to VIM 3*. Eurachem; 2011 ([https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/TAM\\_2011\\_Final\\_web.pdf](https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/TAM_2011_Final_web.pdf), accessed 12 December 2017).
20. *Human biomonitoring: facts and figures*. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2015 (<http://www.euro.who.int/en/media-centre/events/events/2015/04/ehp-mid-term-review/publications/human-biomonitoring-facts-and-figures>, accessed 5 December 2017).
21. Schulz C, Conrad A, Becker K, Kolossa-Gehring M, Seiwert M, Seifert B. Twenty years of the German Environmental Survey (GerES): Human biomonitoring – temporal and spatial (West Germany/East Germany) differences in population exposure. *Int J Hyg Environ Health.* 2007;210(3–4):271–97 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438463907000454?via%3Dihub>, accessed 31 January 2018).
22. National Research Council. *Toxicological effects of methylmercury*. Washington, DC: National Academy Press; 2000 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK225778/>, accessed 31 January 2018).
23. AMAP Assessment 2002: Human health in the Arctic. Oslo: Arctic Monitoring and Assessment Programme; 2003 (<https://www.amap.no/documents/doc/amap-assessment-2002-human-health-in-the-arctic/95>, accessed 31 January 2018).
24. Stern AH. A revised probabilistic estimate of the maternal methyl mercury intake dose corresponding to a measured cord blood mercury concentration. *Environ Health Perspect.* 2005;113(2):155–63 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1277858/>, accessed 31 January 2018).

# Annexe 1. Formulaire de prélèvement de sang ombilical

Nom de la mère	
Numéro de dossier médical	
ID d'étude de la mère	
Agent médical	Signature :  Nom en caractères d'imprimerie :
<b>1. Date et heure du prélèvement</b>	-----/-----/-----/ (jour/mois/année) Début : -----/----- (heure/minute)
<b>2. Combien d'heures avant le prélèvement de l'échantillon avez-vous pris votre dernier repas ?</b>	-- heures
<b>3. Volume de sang prélevé (environ)</b>	-- _ ml

## Annexe 2. Enregistrement des échantillons de sang ombilical

À compléter par la sage-femme

Nom de l'hôpital : \_\_\_\_\_

Nom de la sage-femme chargée de prélever les échantillons : \_\_\_\_\_

Nom du patient	Échantillon ID	Informations sur l'accouchement	Prélèvement de sang ombilical	Informations sur l'échantillon Tube 1	Informations sur l'échantillon Tube 2
		Date : _____ Heure : _____	Heure de début du prélèvement Heure de fin du prélèvement	<b>Tube B1 avec EDTA :</b> volume= _____ ml (min 10 ml) conservé à -20 °C	<b>Tube B2 :</b> volumen _____ ml (min 2 ml) conservé à -20 °C
		Date : _____ Heure : _____	Heure de début du prélèvement Heure de fin du prélèvement	<b>Tube B1 avec EDTA :</b> volume= _____ ml (min 10 ml) conservé à -20 °C	<b>Tube B2 :</b> volume= _____ ml (min 2 ml) conservé à -20 °C
		Date : _____ Heure : _____	Heure de début du prélèvement Heure de fin du prélèvement	<b>Tube B1 avec EDTA :</b> volumen _____ ml (min 10 ml) conservé à -20 °C	<b>Tube B2 :</b> volume= _____ ml (min 2 ml) conservé à -20 °C

EDTA = acide éthylènediaminetétraacétique

# Procédure opératoire standardisée pour évaluer le niveau de mercure dans l'urine

(prélèvement, dosage du mercure, interprétation des résultats)

## Résumé

La présente procédure opératoire standardisée décrit la méthode d'évaluation de l'exposition au mercure au moyen de la biosurveillance humaine, en utilisant l'urine comme matrice biologique. Les méthodes de prélèvement d'urine, de dosage du mercure et d'interprétation des résultats sont exposées dans ce document.

## Mots-clés

Mercure - analyse  
Mercure - urine  
Composés du méthylmercure - analyse  
Urine - chimie  
Biomarqueurs - analyse  
Exposition maternelle  
Échange mère-foetus  
Nourrisson, nouveau-né  
Exposition environnementale

## Contributeurs

Milena Horvat  
Jožef Stefan Institute, Ljubljana, Slovenia  
Vesna Fajon  
Jožef Stefan Institute, Ljubljana, Slovenia  
Janja Snoj Tratnik  
Jožef Stefan Institute, Ljubljana, Slovenia  
Argelia Castaño  
National Centre for Environmental Health, Carlos III Institute of Health, Spain  
Marta Esteban  
National Centre for Environmental Health, Carlos III Institute of Health, Spain  
Greet Schoeters  
VITO, Boeretang, Belgium



# Table des matières

<b>Abréviations .....</b>	<b>102</b>
<b>Introduction : l'urine comme matrice pour la biosurveillance humaine du mercure .....</b>	<b>103</b>
<b>1. Prélèvement des urines .....</b>	<b>104</b>
1.1. Portée de la méthode .....	104
1.2. Précautions nécessaires .....	104
1.3. Matériel requis.....	104
1.4. Préparation/prétraitement du matériel de prélèvement.....	106
1.5. Procédure de prélèvement.....	107
1.6. Étiquetage .....	108
1.7. Transport et conservation de l'échantillon .....	108
1.8. Réception des échantillons.....	108
1.9. Aliquotage/préparation des échantillons .....	110
1.10. Stockage et conservation .....	110
1.11. Contrôle de la qualité.....	110
<b>2. Dosage du mercure dans l'urine .....</b>	<b>111</b>
2.1. Portée de la méthode .....	111
2.2. Principe technique.....	111
2.3. Précautions nécessaires .....	112
2.4. Équipement, matériel et solutions.....	112
2.5. Étalonnage .....	114
2.6. Procédure .....	115
2.7. Calcul des résultats analytiques .....	116
2.8. Contrôle de la qualité.....	117
2.9. Évaluation de la méthode.....	117
<b>3. Dosage de la créatinine dans l'urine .....</b>	<b>122</b>
3.1. Portée de la méthode.....	122
3.2. Principe technique .....	122
3.3. Précautions nécessaires .....	123
3.4. Équipement, matériel et solutions .....	123
3.5. Traitement et préparation des échantillons.....	125
3.6. Procédure.....	126
3.7. Contrôle de la qualité.....	127
3.8. Évaluation de la méthode .....	128
3.9. Sources d'erreur .....	129
3.10. Autre méthode : détermination de la densité relative dans les échantillons d'urine.....	130
<b>4. Interprétation des résultats .....</b>	<b>131</b>
<b>Références .....</b>	<b>132</b>
<b>Annexe 1. Instructions à l'intention des participantes au prélèvement d'urine.....</b>	<b>135</b>
<b>Annexe 2. Questionnaire à remplir lors du prélèvement d'urine .....</b>	<b>136</b>
<b>Annexe 3. Liste de contrôle à remplir à la réception de l'échantillon.....</b>	<b>137</b>

# Abréviations

Hg	Mercure
ID	Identification
LDD	Limite de détection
LDQ	Limite de quantification
SAAVF	Spectrométrie d'absorption atomique de vapeur froide

# Introduction : l'urine comme matrice pour la biosurveillance humaine du mercure

Le mercure (Hg) est naturellement présent dans l'environnement. Il peut également résulter d'activités humaines. On le trouve partout dans la nature sous plusieurs formes chimiques : mercure élémentaire, mercure inorganique (Hg<sup>2+</sup> et ses composés) et mercure organique (principalement le méthylmercure, MeHg) (1).

Le mercure est particulièrement nocif pour le système nerveux, les reins et le système cardiovasculaire. Les effets toxiques du mercure élémentaire et du méthylmercure se manifestent principalement sur le système nerveux, tandis que les dérivés inorganiques du mercure (1, 2) s'accumulent surtout dans les reins.

Les risques d'exposition au mercure élémentaire ou inorganique sont multiples : éclaboussures de mercure, amalgames dentaires, inhalation de vapeurs de mercure à l'intérieur en cas de perforation de thermomètres ou d'ampoules contenant du mercure, utilisation de crèmes et de savons éclaircissants, présence de mercure dans certains médicaments traditionnels, utilisation de mercure dans certaines pratiques culturelles, et exposition professionnelle (3-5).

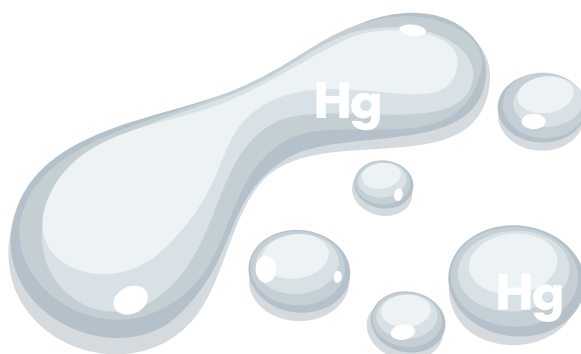
On peut estimer le degré d'exposition au mercure des individus et des groupes de population en mesurant sa concentration dans des matrices biologiques, par exemple les cheveux, le sang ou l'urine (3, 6-8).

La teneur en mercure urinaire – le meilleur indicateur de la concentration de mercure dans les reins selon les scientifiques – est généralement considérée comme la mesure la plus fiable de l'exposition récente aux vapeurs de mercure inorganique ou élémentaire (3).

L'urine est facile à collecter et disponible en plus grande quantité que les autres matrices biologiques. Le prélèvement urinaire ponctuel est généralement préféré au prélèvement effectué sur 24 heures. En effet, un échantillon de 24 heures est plus difficile à recueillir et davantage exposé au risque de contamination en raison de l'ouverture fréquente du flacon.

Le prélèvement urinaire ponctuel présente deux inconvénients : i) la variabilité du volume d'urine excrétée, et ii) la variation parfois sensible de la concentration des substances chimiques endogènes et exogènes entre les jets d'urine, selon le degré d'hydratation, l'intervalle entre les jets, etc. Les échantillons recueillis doivent par conséquent être dilués. Plusieurs méthodes, dont la correction par la créatinine ou la densité relative, peuvent être employées pour ajuster la concentration du biomarqueur urinaire (9-11).

Bien que le prélèvement urinaire ponctuel puisse être effectué à n'importe quel moment de la journée, le recueil du premier jet d'urines, le matin, est recommandé. Autrement, le biomarqueur cible risquerait d'être en deçà de la limite de quantification une fois l'échantillon dilué. Il est également possible de recueillir les urines après au moins cinq heures de continence.



# 1. Prélèvement des urines

## 1.1. Portée de la méthode

La méthode de prélèvement des urines décrite dans cette procédure opératoire standardisée permet d'analyser les concentrations de mercure. Elle couvre l'intégralité des phases préanalytiques de la biosurveillance humaine du mercure réalisées à partir d'échantillons d'urine. Le suivi de la procédure de prélèvement décrite dans le présent document garantit la qualité du recueil et de la manipulation des échantillons biologiques par les techniciens de terrain avant leur analyse en laboratoire.

## 1.2. Précautions nécessaires

Les échantillons d'urine seront directement recueillis par les femmes recrutées. Des mesures de précaution universelles doivent toutefois être prises durant la manipulation des matières biologiques (aliquotage ou autres manipulations de l'urine) :

- Porter des gants, une blouse de laboratoire et des lunettes de protection lors de la manipulation de tissus ou de liquides biologiques ;
- Mettre les éléments jetables en plastique, en verre et en papier (embouts de pipette, tubes d'échantillonneur automatique, gants, etc.) ayant été en contact avec des liquides biologiques, tels que l'urine, dans un sac à autoclave pour déchets à risque biologique ;
- Conserver ces sacs dans des flacons adaptés jusqu'à ce qu'ils soient fermés et autoclavés.

## 1.3. Matériel requis

Le tableau 1 présente le matériel nécessaire au prélèvement et au prétraitement du matériel de prélèvement.

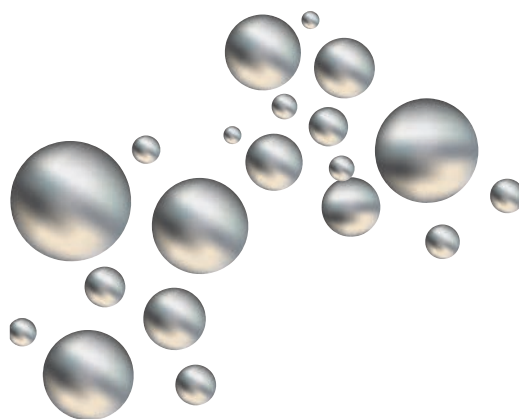


Tableau 1. Matériel de prélèvement des urines

Matériel	Raison	Alternative
Acide nitrique extra pur à 65 %	Utilisé pour le nettoyage des flacons, afin d'éliminer le risque de contamination de fond par le métal.	
Eau purifiée	Utilisée dans le processus de nettoyage.	Eau bidistillée
Bacs	Trois bacs pour le nettoyage : un pour la solution d'acide et deux pour l'eau.	
Flacons de prélèvement (voir ci-dessous)	Flacons dotés d'un système de fermeture hermétique fiable. Leur contenance dépend de la quantité d'urine nécessaire à l'analyse et à la mise en banque (le cas échéant).	
Gants de protection chimique résistants à l'acide	Par précaution.	
Étiquettes	Les échantillons doivent être clairement identifiés.	Écrire le code ID directement sur le flacon à l'aide d'un marqueur permanent.
Marqueur permanent	Pas indispensable, mais très utile pour indiquer la quantité minimale de liquide devant être prélevée.	Tout autre outil pour écrire permettant de faire une marque qui restera clairement lisible.
Papier filtre	Utilisé durant le lavage des flacons.	
Sachets en plastique refermables	Permettent de mieux isoler les flacons.	Tout autre type de sac.
Emballage isotherme	Les échantillons doivent être conservés à 4 °C jusqu'à leur arrivée au laboratoire.	
Étiquettes résistant à la congélation pour le marquage des échantillons	Utilisées pour l'étiquetage des échantillons.	
Acide sulfamique 2 M	Empêche la volatilisation du mercure présent dans l'échantillon d'urine avant l'analyse.	

ID = identité.

Pour l'analyse du mercure, il est nécessaire d'ajouter de l'acide sulfamique 2M dans l'échantillon d'urine, à raison de 10 µl de solution de conservation par 1 ml d'urine (par ex., il est possible d'ajouter jusqu'à 5 ml d'urine dans un tube contenant 50 µl de solution de conservation).

## 1.4. Préparation/prétraitement du matériel de prélèvement

Les flacons de prélèvement doivent être prénettoyés, afin d'éliminer le risque de contamination de fond par le métal. Tous les flacons et leur couvercle doivent être nettoyés avec une solution d'acide nitrique selon la procédure suivante. Le prétraitement des flacons doit s'effectuer dans une hotte de laboratoire en respectant les bonnes pratiques de laboratoire et les directives de sécurité de l'établissement, et en portant un équipement de protection adapté.

1. Indiquer la solution contenue dans chaque bac : acide nitrique à 10 % ; bac de rinçage 1 ; bac de rinçage 2.
2. Placer les bacs dans la hotte.
3. Préparer la solution d'acide diluée avec de l'acide nitrique extra pur à 65 % et de l'eau purifiée (remarque : 18 litres de solution d'acide [2,8 litres d'acide nitrique à 65 % et 15,2 litres d'eau bidistillée] sont nécessaires pour nettoyer environ 240 flacons de 100 ml. La solution d'acide peut être utilisée jusqu'à un mois après sa préparation.)
4. Remplir les bacs avec les solutions correspondantes.
5. Ouvrir les flacons et les déposer avec leur couvercle dans le bac contenant la solution d'acide (laisser tremper durant la nuit ou pendant trois heures minimum). Veiller à ce que les flacons et les couvercles soient complètement immergés (photo 1).

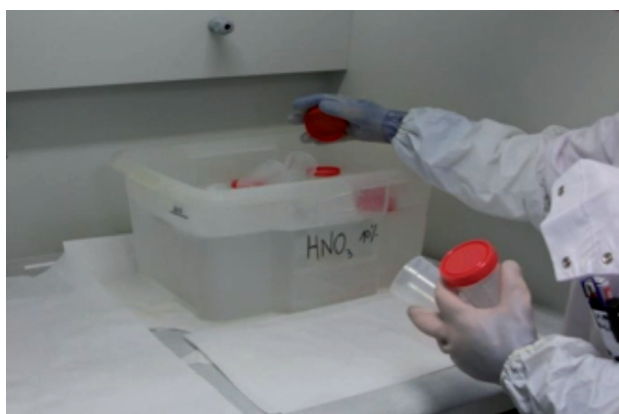


Photo 1. Immersion des flacons et des couvercles dans la solution d'acide.

© Instituto de Salud Carlos III

6. Retirer les flacons du bac de solution d'acide et les déposer dans le premier bac rempli d'eau purifiée. Agiter pendant 2 à 3 minutes. Déposer ensuite les flacons et les couvercles dans le second bac. Agiter de nouveau pendant 2 à 3 minutes (photo 2).

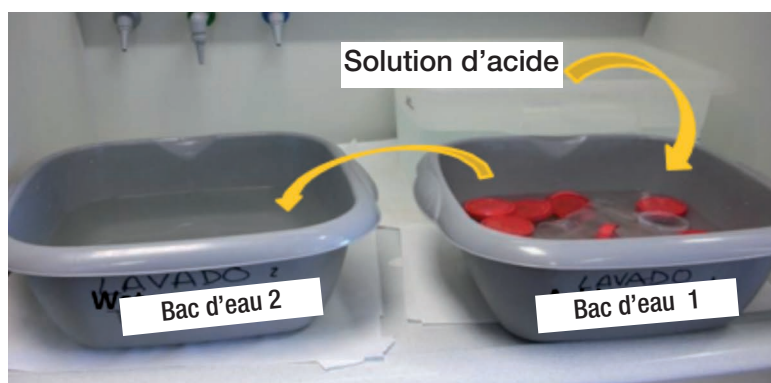


Photo 2. Rinçage des flacons dans les bacs d'eau purifiée.

© Instituto de Salud Carlos III

7. Retirer les flacons et les couvercles du second bac de rinçage et les déposer à l'envers sur une feuille de papier filtre propre à l'intérieur de la hotte pour les faire sécher (photo 3).

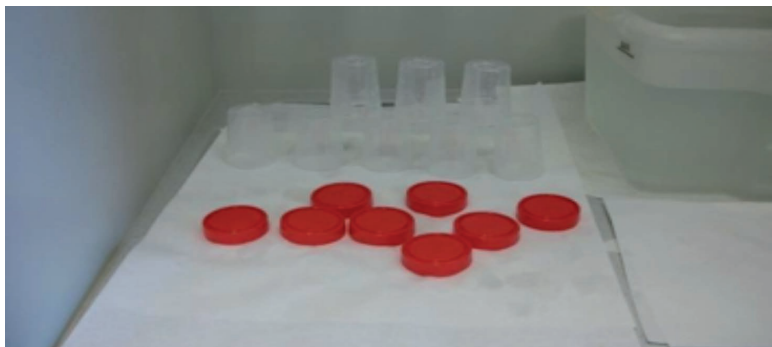
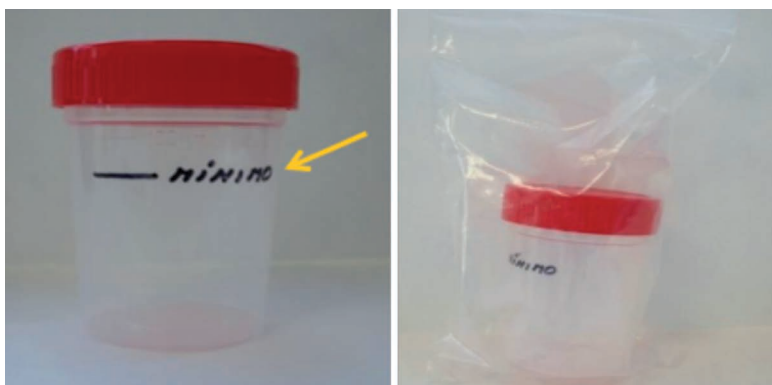


Photo 3. Séchage des flacons et des couvercles dans la hotte.

© Instituto de Salud Carlos III

8. Refermer les flacons. Marquer sur chaque flacon la quantité minimale d'urine voulue (remarque : cette étape est facultative, mais très utile pour éviter les prélèvements insuffisants). Déposer chaque flacon propre dans un sac en plastique refermable (photos 4a et 4b).



Photos 4a et 4b. Indication de la quantité minimale a) et insertion du flacon dans un sac refermable b).

© Instituto de Salud Carlos III

Il convient de vérifier la présence d'une éventuelle contamination après le nettoyage en choisissant 5 % des flacons propres de manière aléatoire et en les remplissant d'eau purifiée. Après 10 minutes d'agitation, prélever un aliquot dans chaque flacon afin de mesurer la quantité de mercure.

Enfin, si les flacons proviennent de différents lots, les informations concernant le lot envoyé à chacun des centres d'échantillonnage doivent être consignées.

## 1.5. Procédure de prélèvement

Les agents de terrain doivent, si possible, remettre les flacons à l'avance aux volontaires, afin que celles-ci puissent recueillir les premières urines du matin (il est également possible de collecter les échantillons d'urine de la mère au moment de son admission à la maternité, avant l'accouchement) Chaque flacon doit être accompagné d'instructions écrites expliquant la procédure de prélèvement (voir exemple à l'annexe 1). De plus, les agents de terrain doivent expliquer personnellement aux volontaires la procédure de prélèvement, répondre à toutes leurs questions et lever les doutes que celles-ci pourraient avoir. Les questionnaires relatifs aux échantillons d'urine (cf. Annexe 2) doivent être remplis au moment du prélèvement.

Les échantillons recueillis doivent être conservés à 4°C jusqu'à leur arrivée au laboratoire. Il est également possible de les aliquoter à la maternité et de les congeler à -20°C. Le cas échéant, la chaîne du froid doit être maintenue durant l'acheminement vers le laboratoire.

**Remarque.** Il convient d'utiliser régulièrement des échantillons témoins représentatifs (au moins un par maternité). Les flacons témoins doivent être ouverts à la maternité et manipulés exactement comme ceux du groupe expérimental, mais sans recueillir d'échantillon. Cette méthode permet de détecter une éventuelle contamination des échantillons sur le site de prélèvement.

## 1.6. Étiquetage

Les flacons de prélèvement peuvent être étiquetés de deux façons :

- À l'avance, après le nettoyage, en indiquant sur l'étiquette le code d'identité (ID) et en laissant un espace libre pour inscrire la date du prélèvement ;
- Après le recueil de l'échantillon : l'agent de terrain étiquette le flacon en indiquant le code ID et la date de prélèvement dès réception de l'échantillon.

## 1.7. Transport et conservation de l'échantillon

Les échantillons d'urine doivent être conservés à 4°C jusqu'à leur arrivée au laboratoire, où ils seront aliquotés et analysés, ou stockés jusqu'à leur analyse (il est également possible de les aliquoter et de les congeler à la maternité.) En outre, le transport des échantillons doit s'effectuer dans le respect des règles en vigueur concernant l'acheminement des matières biologiques. La photo 5 montre le type d'emballage isotherme requis pour le transport des échantillons.



Photo 5. Exemple d'emballage isotherme.

© Instituto de Salud Carlos III

## 1.8. Réception des échantillons

Il convient de contrôler les points suivants au moment de la réception des échantillons d'urine :

- Conditions d'acheminement et de stockage (les échantillons transportés et stockés à une température trop élevée doivent être refusés) ;
- Ajout de conservateurs au cours du prélèvement (le dosage du mercure dans l'urine nécessite l'utilisation d'acide sulfamique 2M) ;
- Le paquet doit être correctement fermé et ne pas avoir été manipulé (remarque : un scellé de sécurité peut être posé sur l'emballage sur le site de prélèvement) ;
- Le paquet doit contenir la totalité des échantillons figurant dans le registre des échantillons collectés ;
- Les échantillons doivent être accompagnés de la documentation correspondante (questionnaires, etc.) ;
- Tous les échantillons et les documents réceptionnés doivent être correctement identifiés à l'aide du code ID correspondant ;
- Les échantillons doivent avoir été correctement prélevés (quantité suffisante) ;
- Le conteneur de transport doit être exempt de toute contamination.



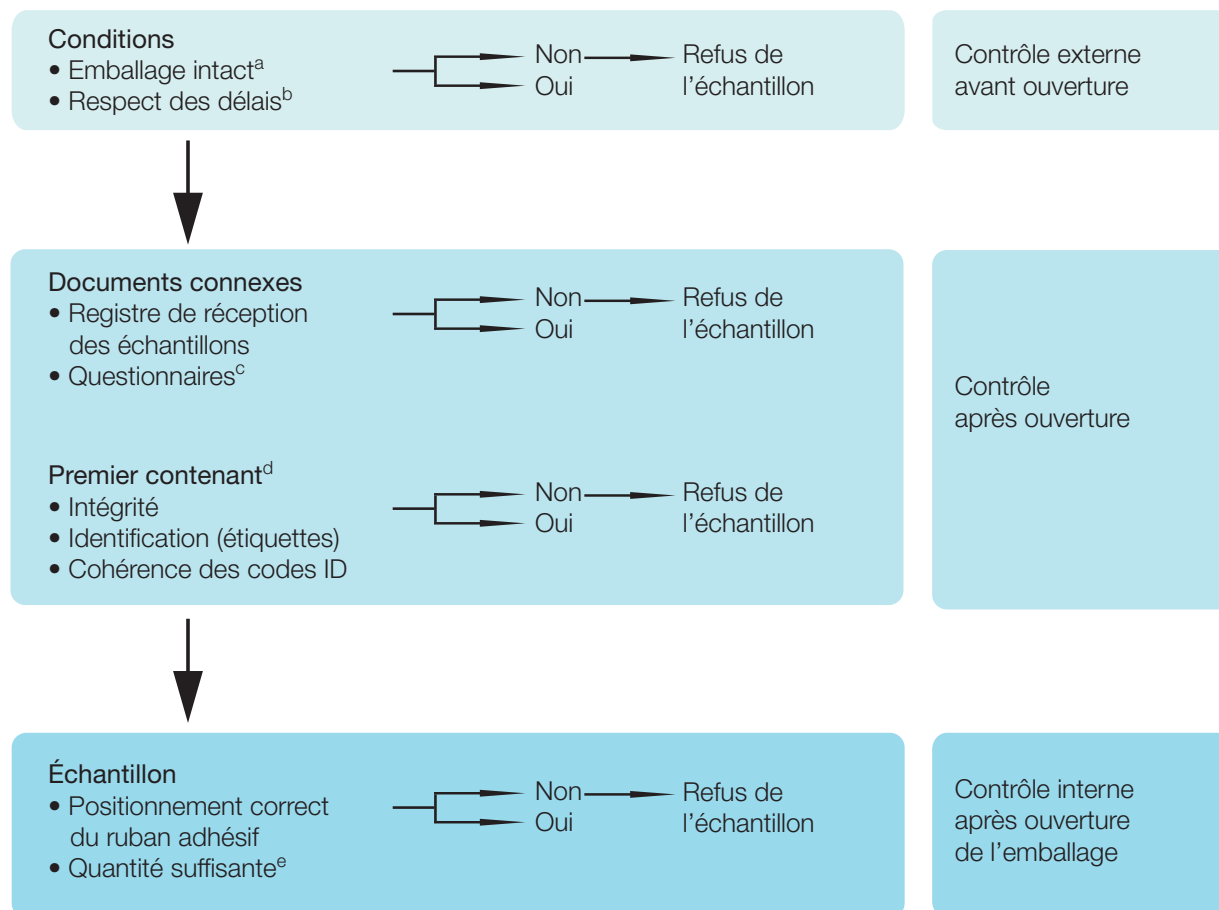
Un modèle d'accusé de réception des échantillons d'urine est proposé à l'annexe 3. Son contenu peut varier en fonction des exigences applicables en matière de conservation des échantillons ou de stabilité/conservation des analytes.

**Remarque.** En cas d'utilisation de blancs de terrain (par ex., des flacons d'eau purifiée), ceux-ci doivent être contrôlés et enregistrés en appliquant la même procédure que pour les autres échantillons.

### 1.8.1. Critères d'acceptation ou de refus des échantillons

Les critères d'acceptation ou de rejet d'un échantillon doivent être définis à l'avance et appliqués durant la phase de réception de l'échantillon. Ces critères doivent porter sur les conditions de transport, la documentation jointe, l'intégrité de l'emballage, la bonne identification des échantillons et la quantité (qui doit être suffisante pour permettre leur analyse et éventuellement, leur dépôt dans des biobanques aux fins d'autres recherches). Afin de suivre un protocole unique et d'appliquer les mêmes critères pour tous les échantillons reçus, il est possible de suivre le plan illustré à la figure 1.

Figure 1. Plan de réception des échantillons



<sup>a</sup> Les lots doivent être correctement fermés et ne pas avoir été manipulés

<sup>b</sup> Le délai maximal entre le prélèvement des échantillons et leur arrivée au laboratoire doit être défini à l'avance.

<sup>c</sup> Si une ou plusieurs questions figurant dans les questionnaires sont cruciales pour l'interprétation des résultats ou représentent un critère d'acceptation ou de refus, elles doivent être vérifiées.

<sup>d</sup> L'état du sachet en plastique refermable doit être contrôlé. Tous les échantillons doivent être correctement identifiés et il faut vérifier qu'il y ait une cohérence entre les codes ID des échantillons et les questionnaires.

<sup>e</sup> La quantité d'échantillon prélevée est un point essentiel. Si la quantité prélevée est insuffisante pour effectuer l'analyse chimique, l'échantillon doit être refusé.

## 1.9. Aliquotage/préparation des échantillons

L'aliquotage des échantillons doit être effectué sur place à l'hôpital ou dans un laboratoire extérieur. La procédure d'aliquotage doit respecter les bonnes pratiques de laboratoire et les directives de sécurité de l'établissement, et nécessite un équipement de protection adapté. Le nombre et le volume des aliquots doivent être estimés de façon à éviter la congélation et la décongélation répétées des échantillons. Le volume des aliquots et le volume minimum requis aux fins d'analyse doivent être définis en concertation avec le laboratoire d'analyse.

La liste exhaustive des tubes nécessaires à l'aliquotage est la suivante :

### 1. Tube U1 (mercure)

a. Verser (sans pipette !) 5 ml d'urine dans un tube propre en plastique et sans métal, contenant de l'acide sulfamique ajouté avant le prélèvement. Bien mélanger.

b. Stocker à -20°C.

### 2. Tube U2 (créatinine)

a. Verser 5 ml d'urine dans un tube de 15 ml en polypropylène.

b. Stocker à -20°C.

3. Autres tubes : l'urine restante peut être transvasée dans des tubes séparés aux fins d'analyses ultérieures. Il est conseillé de stocker également un ou plusieurs tubes en polypropylène en aliquots de 10 ml ou 40 ml dans la biobanque à -80°C.

**Remarque.** L'échantillon original doit être agité entre les aliquots afin de garantir l'homogénéité.

## 1.10. Stockage et conservation

Les échantillons devant être stockés pendant plus d'un mois doivent être congelés. L'urine (même fraîche) contient des sels inorganiques pouvant produire des précipités. Il est donc nécessaire d'homogénéiser les échantillons en les agitant avant l'analyse. Il est également possible d'améliorer la solubilité des sels en ajoutant une petite quantité d'acide chlorhydrique, afin de réduire le pH de l'urine. On fera en sorte d'empêcher la prolifération des micro-organismes, car ils risqueraient d'entraîner la gazéification et la volatilisation du mercure inorganique. On estime à moins de 10 ng/ml la concentration moyenne de mercure présente dans l'urine de la population générale vivant dans une région sans exposition particulière à ce métal. Il est prouvé que le mercure reste stable pendant un an à -20°C.

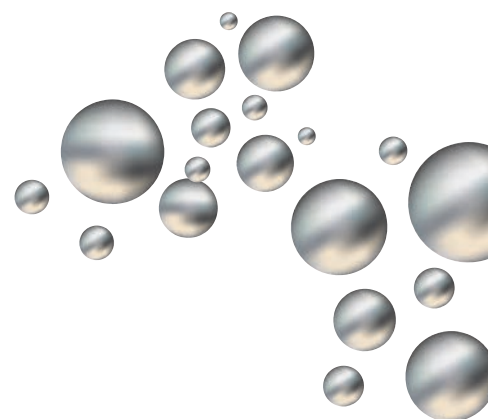
Les échantillons d'urine sont généralement transportés et stockés à -20°C. Il est nécessaire d'établir des procédures de stockage, de façon à contrôler l'emplacement des échantillons, le nombre d'aliquots restants, etc. Les échantillons réceptionnés doivent être congelés à -20 °C jusqu'à leur analyse. Après le prélèvement des aliquots destinés à l'analyse, le reste des échantillons doit être recongelé à -20 °C. La décongélation et la recongélation répétées ne compromettent pas la stabilité des échantillons, même ceux contenant des conservateurs.

## 1.11. Contrôle de la qualité

### 1.11.1. Traçabilité

Il est essentiel d'assurer la traçabilité de l'échantillon tout au long de l'étude, donc celle-ci doit être garantie. Comme indiqué précédemment, il est essentiel d'étiqueter correctement les échantillons et les documents connexes, mais il est aussi nécessaire de pouvoir relier l'échantillon aux informations fournies par le volontaire. Il est fortement conseillé de tenir un registre des échantillons (cf. Annexe 3). Les informations doivent être saisies dans une base de données créée à cet effet. L'accès à ce fichier ou document doit être restreint dès lors que celui-ci contient des données confidentielles à caractère personnel.

Si un échantillon reçoit plusieurs codes ID (par exemple des codes individuels pour les différents aliquots, ou un code interne à l'arrivée au laboratoire), ceux-ci doivent être enregistrés dans la base de données.



## 2. Dosage du mercure dans l'urine

La méthode décrite dans le présent document permet de mesurer la teneur totale en mercure présent dans l'urine de la population générale vivant dans une région faiblement exposée à ce métal, et chez les personnes professionnellement exposées. Cette méthode se fonde sur la digestion acide, la réduction et la mesure par spectrométrie d'absorption atomique de vapeur froide (SAAVF). Cette méthode simple et précise, conçue pour être utilisée avec des instruments faciles d'entretien, a été diffusée par le *National Institute for Minamata Disease* (Japon) (12).

Dans le cas où le laboratoire utilise d'autres équipements pour la détection du mercure au sein d'échantillons traités par digestion acide, il est conseillé de suivre les instructions fournies par le fabricant du matériel. Les instructions relatives au prélèvement et à la manipulation des échantillons fournies dans cette procédure opératoire standardisée sont adaptées quel que soit le matériel utilisé pour la détection du mercure. Il faut toutefois s'assurer que la limite de détection et la limite de quantification peuvent également s'appliquer aux échantillons d'urine humaine.

### 2.1. Portée de la méthode

La procédure décrite porte sur le traitement et l'analyse des échantillons après aliquotage. La teneur totale en mercure dans l'urine chez une population non exposée se situe généralement entre 0,1 ng/ml et 5 ng/ml. Elle peut atteindre jusqu'à 10 ng/ml en cas d'exposition au mercure inorganique ou élémentaire, mais dépasse souvent 50 ng/ml en cas d'exposition professionnelle. La méthode décrite couvre l'ensemble des plages d'exposition habituellement signalées chez les populations générales et dans le cadre d'activités professionnelles.

### 2.2. Principe technique

Les échantillons d'urine sont digérés par des acides et la détection du mercure s'effectue par SAAVF. Cette méthode consiste à réduire le mercure ionique présent dans la solution à sa forme élémentaire et à le transférer dans la cellule d'absorption de l'analyseur de mercure (longueur d'onde de 253,7 nm). Dans ce montage simple, basé sur le système de circulation de l'air libre, l'air ambiant propre fait office de gaz vecteur.

Il existe aujourd'hui de nombreux appareils de dosage du mercure, qui utilisent la méthode de la spectrométrie d'absorption ou de fluorescence atomique. Les laboratoires sont tenus de suivre les consignes d'utilisation fournies par les fabricants de matériel dans leurs procédures (13, 14). Voir également la *Procédure opératoire standardisée pour le dosage du mercure présent dans les cheveux, le sang ombilical et l'urine à l'aide d'une autre méthode*.

## 2.3. Précautions nécessaires

Il convient de prendre des précautions universelles lors de la manipulation de tissus ou de liquides biologiques humains : porter des gants, une blouse de laboratoire et des lunettes de protection. Les éléments jetables en plastique, en verre et en papier (embouts de pipette, tubes d'échantillonneur automatique, gants, etc.) ayant été en contact avec des liquides biologiques, tels que l'urine, doivent être placés dans un sac à autoclave pour déchets à risque biologique. Conserver ces sacs dans des flacons adaptés jusqu'à ce qu'ils soient fermés et autoclavés.

Une fois le travail terminé, il convient de frotter toutes les surfaces de travail sur lesquelles a été effectuée la manipulation des liquides biologiques avec une solution d'hypochlorite de sodium à 10 % (pourcentage volumique) ou équivalent. L'utilisation de la pédale du Micromedic Digiflex est recommandée : elle réduit le contact avec les surfaces de travail et permet à l'analyste d'avoir les mains libres pour manipuler les flacons et les tubes d'échantillonneur automatique. Les échantillons biologiques et les échantillons dilués doivent être jetés dans un sac à autoclave pour déchets à risque biologique à la fin de l'analyse, conformément aux directives relatives à l'élimination des déchets dangereux.

## 2.4. Équipement, matériel et solutions

### 2.4.1. Équipement

La méthode décrite dans cette procédure opératoire standardisée comprend i) la réduction des ions du mercure inorganique présent dans la solution utilisée pour l'analyse à l'aide de chlorure stanneux, afin de produire de la vapeur de mercure élémentaire, et ii) l'introduction de la vapeur de mercure dans la cellule de photo-absorption de l'analyseur de mercure (longueur d'onde de 253,7 nm). Cette méthode utilise le système de circulation de l'air libre (cf. Figure 2). Ce dispositif en circuit fermé comprend une pompe à membrane, une cuve de réaction, un piège à gaz acide, un piège à condensat (bain de refroidissement) et une vanne à quatre voies.

La vapeur de mercure élémentaire produite au cours de l'analyse par l'ajout de chlorure stanneux circule à travers la vanne à quatre voies à une vitesse de 1 l/min à 1,5 l/min pendant 30 secondes, ce qui permet de stabiliser la vapeur de mercure entre les phases gazeuse et liquide. On pivote ensuite la vanne de 90 degrés afin d'introduire d'un seul coup toute la vapeur dans la cellule de photo-absorption. Ce montage permet de mesurer la teneur en mercure d'un échantillon en une minute avec une exactitude et une précision extrêmes, même si la quantité de mercure ne dépasse pas 0,1 ng.

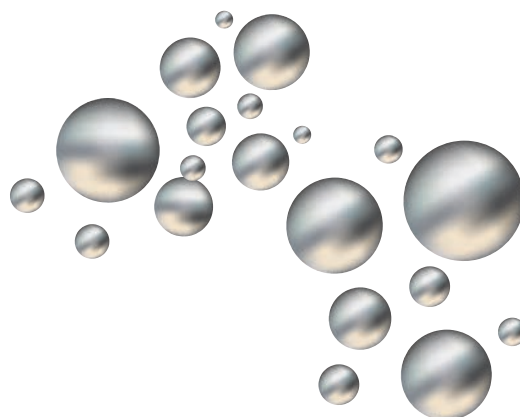
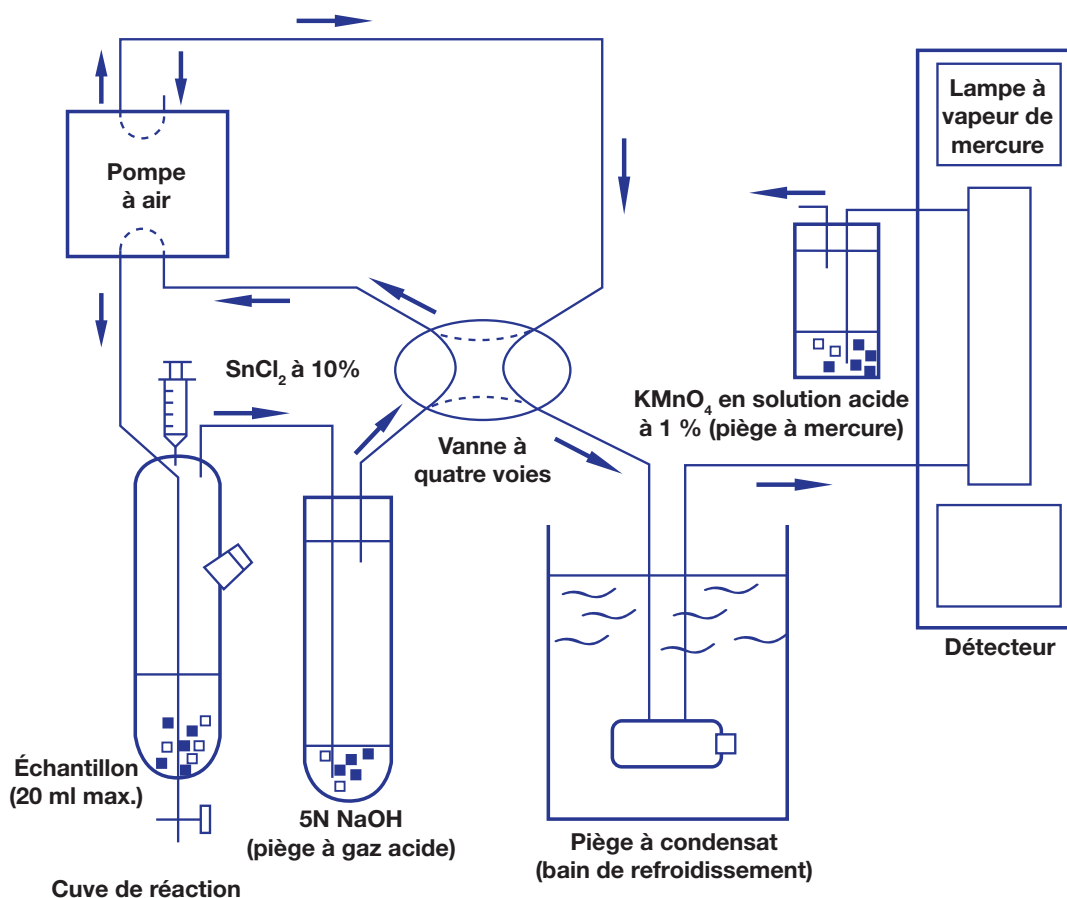


Figure 2. Représentation schématique de la réduction/spectrométrie d'absorption atomique de vapeur froide (système de circulation de l'air libre)



Source : Akagi 1997 (12).

### 2.4.2. Matériel

Le dosage du mercure dans l'urine nécessite le matériel suivant :

- Analyseur de mercure : modèle Hg-201 semi-automatique ;
- Plaque chauffante pouvant atteindre une température de surface de 250°C ;
- Ballon de digestion des échantillons : fiole jaugée de 50 ml en Pyrex épais (hauteur totale 150 mm, diamètre du col 13 mm) ;
- Fioles jaugées de 10 ml, 100 ml et 1000 ml ;
- Pipettes jaugées : 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml et 10 ml ; possibilité d'utiliser des pipettes automatiques (entre 0,1 et 10 ml) ;
- Centrifugeuse ;
- Débitmètre multi-flux : débitmètre multi-kit de type V4.

### 2.4.3. Réactifs et produits chimiques

Le dosage du mercure dans l'urine nécessite les réactifs et les produits chimiques suivants :

- Acide nitrique et acide perchlorique (1 + 1) : mélanger 100 ml d'acide perchlorique (pour le dosage des métaux toxiques) et 100 ml d'acide nitrique (pour le dosage des métaux toxiques). Conserver dans un endroit frais, à l'abri de la lumière.
- Acide sulfurique (pour le dosage des métaux toxiques).

- Eau distillée : distiller de l'eau déionisée et la conserver dans un récipient en verre propre.
- Acide chlorhydrique (qualité analytique).
- Acide sulfamique 2M : remplir partiellement un tube de centrifugeuse de 50 ml en polypropylène prétraité ou prélavé à l'acide avec de l'eau bidistillée. Ajouter 10 g d'acide sulfamique. Remplir jusqu'à la graduation de 50 ml avec de l'eau bidistillée. Dissoudre l'acide sulfamique en mélangeant bien (l'utilisation d'un agitateur-mélangeur de type vortex ou d'un bain-marie peut s'avérer utile). Conserver à température ambiante. Le mélange peut être utilisé jusqu'à douze mois après sa préparation.
- Solution de chlorure d'étain (II) à 10 % : dissoudre 10 g de dihydrate de chlorure d'étain (II) (qualité analytique) dans 9 ml d'acide chlorhydrique, et diluer avec de l'eau distillée jusqu'à obtenir 100 ml. Aérer avec de l'azote gazeux (100 ml/min pendant 20 min à 30 min) afin d'évacuer tout le mercure présent dans la solution.
- Hydroxyde de sodium 5M : dissoudre 20 g d'hydroxyde de sodium (qualité analytique) dans de l'eau distillée afin d'obtenir un volume final de 100 ml.
- Hydroxyde de sodium 0,1M : diluer de l'hydroxyde de sodium 5N 50 fois avec de l'eau distillée.
- Acide sulfurique 2M : verser petit à petit 30 ml d'acide sulfurique (pour le dosage des métaux toxiques) dans de l'eau distillée afin d'obtenir un volume final de 1000 ml.
- Solution de permanganate de potassium à 0,5 % : dissoudre 0,5 g de permanganate de potassium (qualité analytique) dans de l'eau distillée afin d'obtenir un volume final de 100 ml. Cette préparation sert au nettoyage de la verrerie.

#### 2.4.4. Références d'étalonnage

##### Solution étalon de mercure inorganique

Incorporer 13,5 mg de chlorure de mercure (II) dans une fiole jaugée de 100 ml. Dissoudre dans 4 ml d'acide nitrique-acide perchlorique (1 + 1) et 10 ml d'acide sulfurique versés l'un après l'autre. Ajouter de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge, afin d'obtenir une solution mère de mercure (1 ml de solution mère = 100 µg de mercure). La solution mère de mercure ainsi obtenue restera stable pendant plusieurs années, à condition d'être fermée et conservée au frais et à l'abri de la lumière. À chaque utilisation, la solution mère doit être diluée 10 000 fois avec la solution d'essai à blanc ci-dessus afin d'obtenir une solution étalon de mercure (1 ml de solution étalon = 0,010 µg de mercure). Cette opération doit s'effectuer en deux étapes consécutives. Les dilutions doivent être réalisées à une température ambiante comprise entre 20°C et 23°C.

##### Solution étalon de mercure

Le *National Institute of Standards and Technology* (NIST) propose une solution étalon de mercure (SRM 3177) préparée à partir de chlorure de mercure (II) extra pur, utilisable aux fins d'étalonnage. Une unité de cette solution se compose de cinq ampoules de verre au borosilicate contenant chacune environ 10 ml de solution. Une valeur certifiée est assignée au mercure, dont la fraction de la masse nominale est de 1 mg/g. Les solutions étalons de travail sont préparées en effectuant une dilution au 1:10 000. La solution de travail destinée à l'étalonnage est préparée en deux temps, afin d'obtenir une concentration de 0,010 µg/ml.

## 2.5. Étalonnage

Il n'est pas toujours nécessaire de recourir à une courbe d'étalonnage multipoints, puisque la courbe d'étalonnage suit une trajectoire linéaire dans un large spectre de concentrations. Par conséquent, on lui préférera une courbe d'étalonnage à trois points. Outre la solution à blanc, il faut choisir la concentration (par ex., 0,01 µg, 0,03 µg ou 0,05 µg de mercure/50 ml) de solution étalon la mieux adaptée au dosage du mercure, en veillant à ce que la hauteur des pics soit proche de celle de la

solution utilisée pour l'analyse des échantillons. Le cas échéant, il convient d'utiliser le même volume de solution étalon et de solution d'analyse des échantillons, de manière à simplifier la quantification.

## 2.6. Procédure

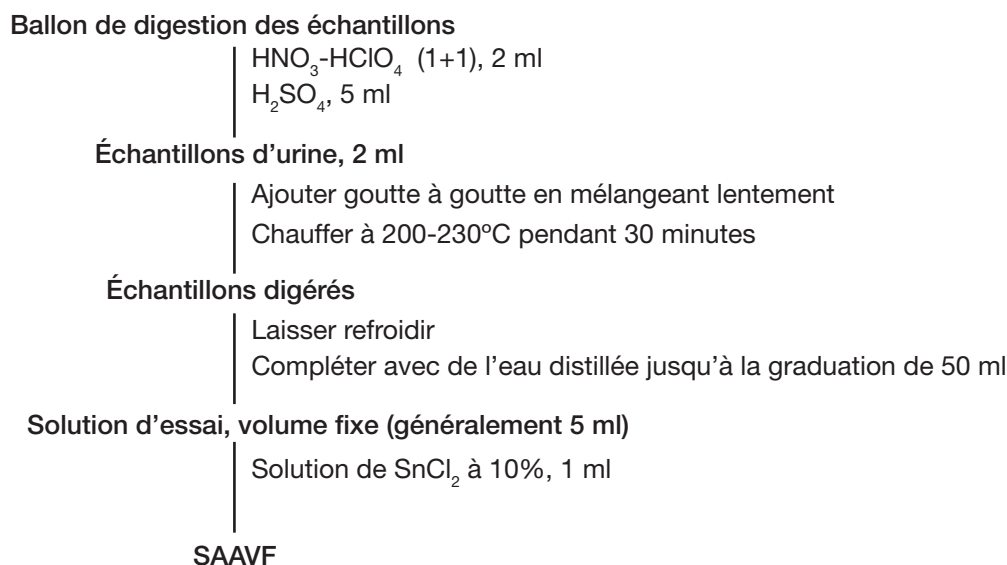
### 2.6.1. Digestion acide

La procédure de dosage du mercure dans l'urine est illustrée dans la figure 3 ci-dessous. Verser 2 ml d'acide nitrique-acide perchlorique (1 + 1) et 5 ml d'acide sulfurique dans un ballon de digestion. Ajouter progressivement un volume connu (généralement 2 ml) de l'échantillon d'urine en mélangeant lentement. Procéder de la même façon pour la solution d'essai à blanc et la solution étalon.

Chaque échantillon doit être préparé en double. La préparation de la solution à blanc est identique à celle de l'échantillon, mais sans ajout d'urine. Même chose pour la solution d'essai étalon, sauf que l'urine est remplacée par la solution étalon de mercure. Au moins trois points d'étalonnage sont nécessaires, généralement situés entre 0,5 ng/ml et 5 ng/ml.

Les fioles contenant les échantillons doivent être chauffées sur une plaque pendant 30 minutes à 200-230°C. Une fois que les récipients ont refroidi, on ajoute de l'eau distillée jusqu'à obtenir un volume fixe de 50 ml. Bien mélanger et utiliser les solutions ainsi obtenues pour l'analyse des échantillons.

Figure 3. Dosage du mercure dans l'urine



SAAVF = spectrométrie d'absorption atomique de vapeur froide

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = acide sulfurique

HNO<sub>3</sub>-HClO<sub>4</sub> = acide nitrique-acide perchlorique ;

SnCl<sub>2</sub> = chlorure d'étain (II)



## 2.6.2. Mesure

Le montage automatique utilisé pour ce processus est commercialisé sous le nom Model Hg-201 Semiautomated Mercury Analyser (analyseur de mercure semi-automatique, modèle Hg-201).

Transvaser doucement les volumes connus de solution d'essai (généralement 5 ml, maximum 10 ml) dans la cuve de réaction de l'analyseur de mercure. Ajouter de l'eau exempte de mercure jusqu'à la graduation de 20 ml et mettre le bouchon. Ajouter 1 ml de chlorure d'étain (II) à 10 % dans une solution d'acide chlorhydrique 1N avec le distributeur et appuyer sur le bouton « Démarrer ». La pompe à membrane se met en route. La vapeur de mercure élémentaire ainsi produite circule à travers la vanne à quatre voies entre la cuve de réaction et le piège à gaz acide pendant 30 secondes, jusqu'à ce qu'elle soit stabilisée entre les phases gazeuse et liquide. Le gaz acide généré par la solution d'analyse des échantillons est recueilli dans la solution alcaline. La vanne à quatre voies pivote automatiquement de 90 degrés au bout de 30 secondes. Un bain de refroidissement permet alors d'introduire la vapeur de mercure dans la cellule de photo-absorption, afin de mesurer l'absorbance. On observe alors un pic abrupt des données enregistrées. Lorsque les relevés de l'enregistreur commencent à baisser, ouvrir la vanne située au bas de la cuve de réaction afin d'éliminer la solution. Refermer la vanne et aérer la cuve jusqu'à ce qu'elle retrouve son niveau normal. Appuyer sur le bouton de réinitialisation pour lancer la deuxième analyse. Il convient de mesurer d'abord les solutions d'essai à blanc, puis les solutions étalons. Les solutions d'analyse des échantillons peuvent être mesurées si la courbe d'étalonnage est acceptable.

**Remarque.** La concentration d'équilibre entre les phases liquide et gazeuse de la vapeur de mercure réduite diffère selon la concentration d'acide et le volume de la solution d'analyse des échantillons au moment de la prise de mesure. Par conséquent, on utilise la solution d'essai à blanc pour diluer la solution d'analyse des échantillons. La solution d'analyse et la solution étalon sont mesurées exactement dans les mêmes conditions (concentration et volume d'acide).

## 2.7. Calcul des résultats analytiques

Les hauteurs de pics (en mm) obtenues après avoir mesuré les volumes connus des solutions à blanc, étalon et d'analyse (ou leurs solutions diluées) sont respectivement étiquetées  $P_{\text{à blanc}}$  (solution à blanc),  $P_{\text{étalon}}$  (solution étalon) et  $P_{\text{échantillon}}$  (solution d'analyse de l'échantillon). La concentration totale de mercure dans l'échantillon se calcule de la façon suivante :

$$c_{\text{sample}} = \left( \frac{P_{\text{sample}} - P_{\text{blank}}}{P_{\text{std}} - P_{\text{blank}}} \right) \cdot F \cdot \frac{c_{\text{std}}}{m_{\text{sample}}}$$

$c_{\text{sample}}$  (c échantillon) – concentration de mercure dans l'échantillon (ng/ml ou ng/g)

$c_{\text{std}}$  (c étalon) – concentration de mercure dans la solution étalon (ng/ml) ; par exemple 10 ng/ml

$P_{\text{sample}}$  (P échantillon) – hauteur du pic en mm pour l'échantillon digéré (pour 5 ml prélevés sur les 50 ml de l'échantillon digéré)

$P_{\text{std}}$  (P étalon) – hauteur du pic en mm pour la solution étalon (1 ml de solution étalon de 10 ng/ml a été préparé de la même façon que l'échantillon, et 5 ml sur les 50 ml de cet échantillon ont été prélevés aux fins d'analyse)

$P_{\text{blank}}$  (P à blanc) – hauteur du pic en mm de la solution d'essai à blanc

F – facteur de dilution de l'étalon (l'étude de cas ci-dessus applique un facteur de dilution de 0,1 ; 1 ml de solution étalon contenant 10 ng/ml a été dilué 50 fois et 5 ml ont été prélevés aux fins d'analyse)

$m_{\text{sample}}$  (m échantillon) – masse de l'échantillon en g ou ml



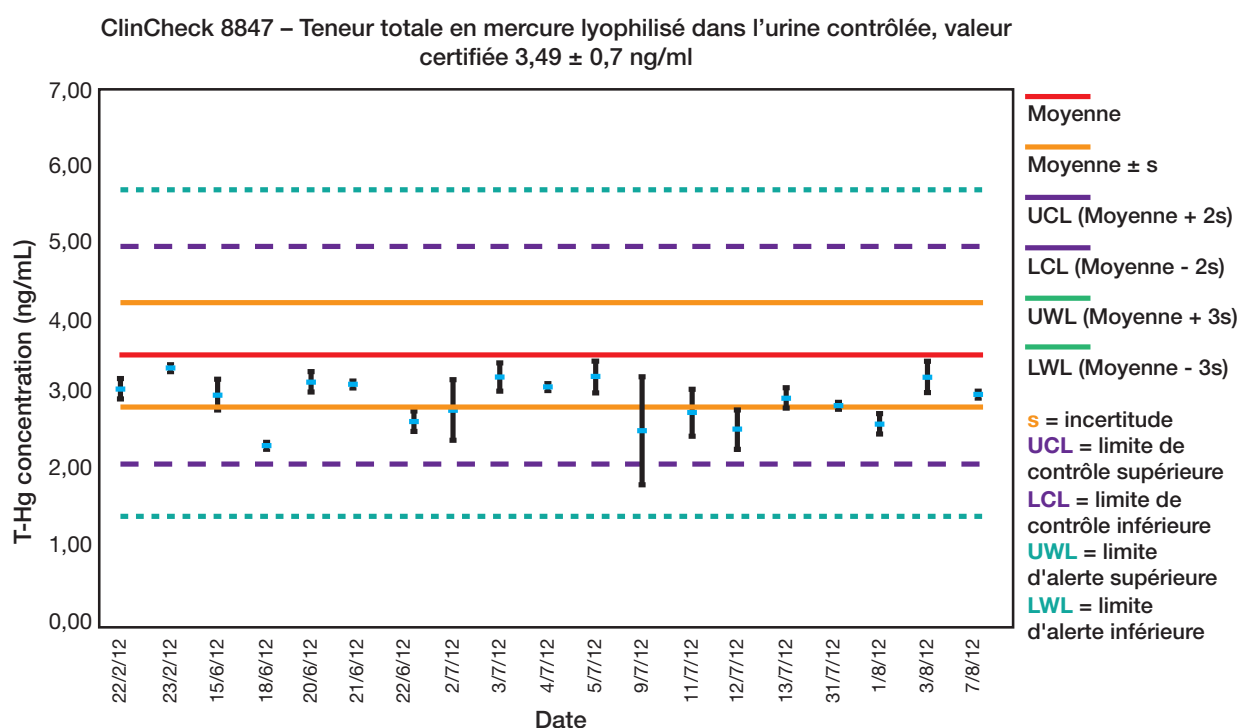
## 2.8. Contrôle de la qualité

Cette procédure opératoire standardisée a été effectuée au moyen de deux matériaux de référence : Clin Chek 8847 (Recipe, Allemagne) et Seronorm trace elements urine – blank (Sero As, Norvège). Les concentrations des matériaux de référence certifiés utilisés pour le dosage du mercure dans l'urine doivent correspondre à la plage de concentration mesurée dans l'échantillon.

Chaque échantillon doit être analysé en double. Si l'écart de résultat entre les deux répliquats est supérieur à 10 %, l'échantillon doit être réanalysé.

À chaque étape de l'analyse, il est nécessaire d'analyser les trois solutions à blanc et les solutions dupliquées du matériau utilisé pour le contrôle de la qualité (si possible le matériau de référence), et de préparer les graphiques correspondants (cf. Figure 4).

Figure 4. Graphique du contrôle de la qualité (ClinChek 8847)



T-Hg concentration = concentration totale en mercure

Date dd/mm/yy = Date (jj/mm/aa)

## 2.9. Évaluation de la méthode

Chaque laboratoire doit appliquer la norme ISO/IEC 17025:2005 intitulée *Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais* (15). La méthode doit être validée selon ses critères de performance (sensibilité, linéarité, récupération, fiabilité, précision, exactitude, limite de détection, etc.) et s'accompagner d'une estimation de l'incertitude de mesure, puisque cette dernière est une propriété fondamentale de tout résultat et fait partie des exigences de la norme ISO/IEC 17025:2005. Le mercure est présent dans l'urine en faible quantité. Afin de pouvoir mesurer la concentration chez la population générale, la limite de détection de la méthode doit être d'au moins 0,05 ng/ml, et la limite de quantification d'au moins 0,1 ng/ml.

Les critères de performance et l'estimation de l'incertitude de mesure applicables à la méthode décrite dans cette procédure opératoire standardisée sont présentés ci-dessous.

### 2.9.1. Limites de détection et de quantification

La limite de détection a été calculée en évaluant la concentration de mercure dans dix solutions à blanc. Celle-ci était de  $0,10 \pm 0,010$  ng pour 50 ml de solution à blanc. La limite de détection a été calculée à l'aide de l'équation suivante.

$$LOD = 3 \cdot SD_{blank}$$

SD – standard deviation (écart-type)

La limite de détection de l'échantillon a ensuite été calculée comme suit.

$$LOD = \frac{3 \cdot SD_{blank}}{V_{sample}(m_{sample})}$$

$V_{sample}$  – volume (ml) ou masse (g) de l'échantillon

$m_{sample}$  – masse de l'échantillon en g ou en ml

Dans le cas ci-dessus, la limite de détection était de 0,03 ng/50 ml, et la limite de quantification pour la dose de 2 ml de l'échantillon était de 0,015 ng/ml.

La limite de quantification a été calculée comme le quintuple de la limite de détection.

$$LOQ = 5 \cdot LOD$$

La limite de quantification s'élève à 0,075 ng/ml dans l'exemple ci-dessus.

### 2.9.2. Précision

L'analyse régulière d'échantillons d'urine sur une longue période (par ex., un an) permet de mesurer le degré de reproductibilité de la méthode analytique décrite. Les résultats d'une série de mesures ( $n = 15$ ) de la teneur totale de mercure dans l'urine sont présentés dans le tableau 2 à titre d'exemple. Chaque échantillon a été analysé en deux réplicats.

Tableau 2. Résultats du double dosage du mercure dans des échantillons d'urine et écarts relatifs

Échantillon	Résultat D1 (ng/ml)	Résultat D2 (ng/ml)	Valeur moyenne (D1+D2/2)	Écart (D1-D2)	Écart relatif (D1-D2/moyenne)
Urine 1	2,02	1,62	1,82	0,40	0,22
Urine 2	0,71	0,63	0,67	0,08	0,12
Urine 3	0,51	0,51	0,51	0,00	0,00
Urine 4	0,54	0,51	0,53	0,03	0,06
Urine 5	1,19	1,27	1,23	-0,08	-0,07
Urine 6	0,67	0,67	0,67	0,00	0,00
Urine 7	1,66	1,62	1,64	0,04	0,02
Urine 8	3,80	3,76	3,78	0,04	0,01
Urine 9	0,59	0,55	0,57	0,04	0,07
Urine 10	0,61	0,69	0,65	-0,08	-0,12
Urine 11	0,69	0,69	0,69	0,00	0,00
Urine 12	0,61	0,55	0,58	0,06	0,10
Urine 13	0,92	0,98	0,95	-0,06	-0,06
Urine 14	0,72	0,70	0,71	0,02	0,03
Urine 15	0,79	0,74	0,77	0,05	0,07

D1 = mesure 1 ; D2 = mesure 2.

Afin d'évaluer la reproductibilité ou la répétabilité, on calcule l'écart-type de la double analyse à l'aide de l'équation suivante.

$$RSD_d = \frac{s_d}{\sqrt{n}}$$

$RSD_d$  – écart-type relatif des mesures des réplicats

$s_d$  – écart-type des écarts relatifs  $([D1-D2]/\text{moyenne})$

$n$  – nombre de réplicats ( $n = 2$ )

La répétabilité obtenue pour cet ensemble de mesures s'élevait à 5,9 %.

### 2.9.3. Justesse des résultats

La justesse de nos résultats a été estimée à l'aide du matériau de référence ClinChek Urine Controls (niveau I). Afin d'évaluer la justesse de nos résultats, nous avons calculé la récupération ( $R$ ) à partir des mesures du matériau de référence effectuées sur une période de six mois. Les niveaux observés ont été comparés à la valeur de référence à l'aide de l'équation suivante.

$$R = \frac{\text{valeur observée}}{\text{valeur de référence}}$$

$R$  – récupération

Un exemple des mesures de la teneur totale en mercure dans le matériau de référence est fourni dans le tableau 3.

Tableau 3. Mesures de la teneur totale en mercure dans ClinChek Urine Controls (niveau I)

Date	Valeur moyenne (ng/ml)	Valeur de référence (ng/ml)	Récupération (%)
date 1	2,99	3,49	86
date 2	3,27	3,49	94
date 3	2,94	3,49	84
date 4	2,28	3,49	65
date 5	3,10	3,49	89
date 6	3,05	3,49	87
date 7	2,69	3,49	77
date 8	2,73	3,49	78
date 9	3,22	3,49	92
date 10	2,99	3,49	86
date 11	3,18	3,49	91
date 12	2,72	3,49	78
date 13	2,57	3,49	74
date 14	2,86	3,49	82
date 15	2,80	3,49	80
date 16	2,62	3,49	75
date 17	3,26	3,49	93
date 18	2,97	3,49	85

Le taux de récupération calculé à partir des mesures fournies dans le tableau 3 s'élevait à 83 %.

## 2.9.4. Incertitude de mesure

L'incertitude de mesure de la teneur totale en mercure dans l'urine par digestion acide et SAAVF a été estimée en utilisant la méthode et les données de validation fournies dans le *Guide ISO pour l'expression de l'incertitude de mesure*. La procédure est décrite dans le guide EURACHEM/CITAC intitulé *Quantifier l'incertitude des mesures analytiques (16)*.

Étape 1. La grandeur mesurée reprend l'expression quantitative qui établit une corrélation entre la valeur de la grandeur mesurée et les paramètres dont celle-ci dépend (décrits dans le paragraphe 2.7).

$$c_{sample} = \left( \frac{P_{sample} - P_{blank}}{P_{std} - P_{blank}} \right) \cdot F \cdot \frac{C_{std}}{m_{sample}}$$

Étape 2. Les sources d'incertitude ont été repérées sur la base de l'expression quantitative. Elles comprennent notamment les paramètres recensés dans le tableau 4.

Tableau 4. Composantes de l'incertitude pour la teneur totale de mercure dans l'urine

Paramètres d'entrée	Valeur	Incertitude standard	Incertitude standard relative (%)
Signal échantillon ( $P_{sample}$ )	30,0 mm	0,5 mm	1,6
Masse de l'échantillon ( $m_{sample}$ )	20 mg	0,06 mg	0,29
Volume d'un échantillon dans une fiole jaugée ( $V_{tot}$ )	50 ml	0,12 ml	0,24
Volume d'un aliquot de l'échantillon analysé ( $V_{analysed}$ )	5 ml	0,0095 ml	0,2
Concentration de la solution étalon ( $C_{std}$ )	10 ng/ml	0,014 ng/ml	0,14
Volume de solution étalon ( $V_{std}$ )	0,1000 ml	0,00094 ml	0,94

Étape 3. Cette étape porte sur la quantification des composantes d'incertitude. Tous les facteurs d'incertitude doivent être exprimés sous forme d'incertitudes standard, c'est-à-dire d'écart-types.

Les incertitudes standard liées aux composantes identifiées dans l'expression quantitative ont été obtenues à partir de données expérimentales (volume des pipettes, etc.) ou du certificat du fabricant (bilan massique, fiole jaugée, etc.).

L'estimation des incertitudes standard est fournie dans le tableau 4. Les incertitudes standard relatives n'excédant pas 10 % du facteur d'incertitude maximal ne sont pas prises en compte dans l'estimation de l'incertitude de mesure. Les incertitudes liées à la hauteur du pic ( $u_p$ ) et au volume de la solution étalon ( $U_{V_{std}}$ ) sont particulièrement importantes.

Des composantes d'incertitude supplémentaires ont été estimées à partir de données de validation, à savoir des données sur la reproductibilité (répétabilité) et sur la récupération.

L'incertitude de la répétabilité ( $u_{rep}$ ) s'élevait à 5,9 % (cf. paragraphe 2.9.2), tandis que l'incertitude de la récupération ( $u(R_m)$ ) atteignait 8,5 % et a été calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$u(\bar{R}_m) = \bar{R}_m \times \sqrt{\frac{s_{obs}^2}{n \cdot \bar{C}_{obs}^2} + \frac{u(C_{ref})}{C_{ref}}^2}$$

$R_m$  – récupération

$s_{obs}$  – écart-type des données observées

$C_{obs}$  – valeur moyenne des données observées

$C_{ref}$  – valeur de référence

$u(C_{ref})$  – incertitude de la valeur de référence

La quatrième et dernière étape porte sur le calcul de l'incertitude combinée. Avant d'effectuer le regroupement, tous les facteurs d'incertitude doivent être exprimés sous forme d'incertitudes standard (écarts-types). L'incertitude combinée ( $u_c$ ) a été calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$u_c = \sqrt{u_p^2 + u_{vstd}^2 + u_{rep}^2 + u_{rec}^2}$$

$u_c$  – incertitude combinée

$u_p$  – erreur due à l'itération des mesures

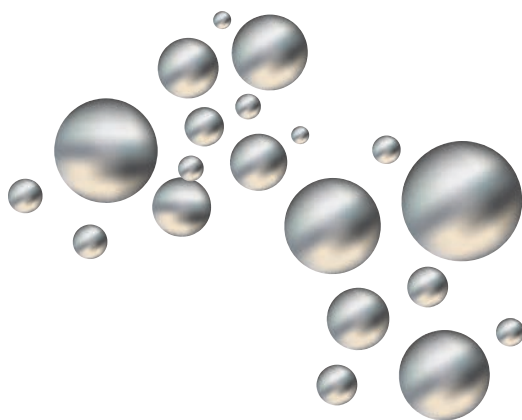
$u_{vstd}$  – erreur due aux étalons

$u_{rep}$  – erreur due à la reproductibilité

$u_{rec}$  – erreur due à la récupération

L'incertitude élargie ( $U$ ) a été exprimée en multipliant  $u_c$  par le facteur  $k$ . Le choix du facteur  $k$  dépend du niveau de confiance souhaité. Pour un niveau de confiance approximatif de 95 %,  $k$  doit être égal à 2.

L'incertitude de mesure estimée pour la détermination de la teneur totale en mercure dans l'urine par digestion acide et SAAVF s'élève à 11 %, et l'incertitude élargie ( $k = 2$ ) à 22 %. Cette estimation est valable pour une fourchette d'exposition « normale » (moins de 5 ng/ml).



## 3. Dosage de la créatinine dans l'urine

La concentration de mercure et d'autres produits chimiques dans l'urine peut varier sensiblement selon le facteur de dilution à l'eau. Le dosage des agents contaminants présents dans l'urine est souvent exprimé en microgrammes d'agent contaminant par gramme de créatinine (3). La créatinine est un sous-produit du métabolisme protéique des muscles formé à partir de la phosphocréatine. La créatinine est presque entièrement excrétée par filtration glomérulaire rénale. Un adulte de poids normal ayant entre 30 ans et 60 ans excrète en moyenne entre 1,0 g et 1,6 g de créatinine par jour.

Chez les individus en bonne santé, la formation physiologique de la créatinine est essentiellement proportionnelle à la masse musculaire, ce qui explique que l'excrétion de créatinine soit généralement plus faible chez les femmes que chez les hommes. Chez les enfants, la quantité de créatinine excrétée par jour est très corrélée à l'âge. Outre l'âge et le sexe, l'excrétion de créatinine dépend particulièrement de la consommation de viande et de la prise de certains médicaments, parmi lesquels les opiacés et les diurétiques. La production d'urine peut varier sensiblement en fonction de l'absorption ou de la perte de fluides, et de la consommation de café, d'alcool ou de médicaments. En revanche, l'excrétion de créatinine se maintient à un niveau relativement constant durant la journée, où seules quelques fluctuations diurnes peuvent se manifester. Pour cette raison, la concentration de créatinine dans l'urine sert généralement de valeur de référence pour l'analyse des matériaux et de leurs métabolites présents dans l'urine. Ainsi, les variations diurnes de la dilution de l'urine peuvent être compensées aux fins d'analyse de l'exposition aux substances xénobiotiques. Cependant, il n'est pas toujours pertinent de corréliser la concentration de substances dangereuses dans l'urine avec la concentration de créatinine, et il convient de tenir compte des facteurs susmentionnés ayant une incidence sur son excrétion.

Si les substances xénobiotiques sont réabsorbées en fortes quantités dans la région tubulaire des reins, on ne peut supposer que leur concentration soit directement corrélée avec celle de la créatinine (17, 18). De même, les taux de concentration obtenus en utilisant la créatinine comme valeur de référence sont non valables si les échantillons d'urine sont très dilués ou très concentrés.

C'est pourquoi, en principe, la *Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area* recommande de ne pas mesurer la concentration de substances dangereuses ou de métabolites dans l'urine en se basant sur la concentration de créatinine.

La concentration de créatinine doit néanmoins être mesurée dans chaque échantillon d'urine aux fins de dosage de substances dangereuses, de sorte à faciliter l'évaluation des résultats obtenus. Si elle est inférieure à 0,5 g/l ou supérieure à 2,5 g/l, les résultats du dosage des substances dangereuses ou de leurs métabolites ne doivent pas être pris en compte dans le rapport d'analyse (17).

### 3.1. Portée de la méthode

La méthode décrite ici se fonde sur la réaction de Jaffé (19). Elle permet de déterminer le taux de créatinine dans l'urine sur une échelle miniature de manière rapide et précise, à l'aide d'un lecteur de microplaques à absorbance. La plage d'essai de la méthode est supérieure à 0,004 mg de créatinine/ml d'urine.

Cette méthode a principalement l'avantage de permettre l'analyse d'un grand nombre d'échantillons en un laps de temps très court. Elle permet, en outre, de stabiliser les conditions de réaction puisque la totalité des échantillons est analysée durant la phase finale de la réaction, minimisant ainsi le risque de fluctuation temporaire des mesures.

### 3.2. Principe technique

Les échantillons d'urine dilués selon un facteur de dilution de 1:50 sont déposés sur une microplaque et complétés par de l'acide picrique et de l'hydroxyde de sodium. Après un temps de réaction de

30 minutes, on mesure l'absorbance du produit de réaction à l'aide d'un lecteur de microplaques à absorbance (longueur d'onde maximale de 500 nm).

L'étalonnage s'effectue avec des solutions étalons de créatinine aqueuses. Celles-ci subissent le même traitement que les échantillons : on y ajoute de l'acide picrique et de l'hydroxyde de sodium, et on les mesure au moyen d'un lecteur de microplaques.

### 3.3. Précautions nécessaires

Il convient de prendre les précautions ci-dessous lors du dosage de la créatinine dans l'urine :

- Prendre des précautions concernant les risques biologiques durant la manipulation des urines.
- Diluer les échantillons d'urine dans un poste de sécurité biologique.
- Porter des gants, une blouse de laboratoire et des lunettes de protection pour manipuler toutes les solutions.
- Déposer les déchets et les résidus biologiques dans des contenants adaptés. Les embouts de pipette, tubes d'échantillonneur automatique, gants et autres éléments ayant été en contact avec l'urine doivent être déposés dans un sac ou un récipient à autoclave pour déchets à risque biologique.

### 3.4. Équipement, matériel et solutions

#### 3.4.1. Équipement

Le dosage de la créatinine dans l'urine nécessite l'équipement suivant :

- Agitateur vortex pour agiter les échantillons d'urine avant le prélèvement de l'aliquot à analyser ;
- Micropipette 10-100 µl ;
- Micropipette 100-1000 µl ;
- Micropipette 1-10 ml ;
- Pipette à canaux multiples 50-300 µl ;
- Balance de précision (lecture : 0,01 ml) ;
- Centrifugeuse ;
- Agitateur pour microplaques ;
- Spectrophotomètre ;
- Congélateur (pour la conservation de longue durée des échantillons et des réactifs) ;
- Réfrigérateur (pour la conservation de moyenne durée des solutions-mères étalons et des réactifs) ;
- Système de purification de l'eau (pour l'eau bidistillée ultrapure utilisée dans la préparation des réactifs et de la dilution)
  - ce système permet de produire de l'eau déionisée jusqu'à  $>18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ .

#### 3.4.2. Matériel

Le dosage de la créatinine dans l'urine nécessite le matériel suivant :

- Gants (sans poudre, en nitrile ou en latex, avec une faible teneur en particules)
- Embouts de pipette (1000 µl, 100 µl et 10 ml)
- Microplaques de dosage à 96 puits
- Tubes à essai en polypropylène de 1, 5, 10 et 50 ml.

### 3.4.3. Réactifs et produits chimiques

Le dosage de la créatinine dans l'urine nécessite les réactifs et les produits chimiques suivants :

- eau ultrapure
- solution d'acide picrique à 1,2 %
- hydroxyde de sodium (qualité analytique)
- acide chlorhydrique à 37 %

### 3.4.4. Matériaux de référence

Les matériaux de référence suivants sont nécessaires au dosage de la créatinine dans l'urine :

- Créatinine SRM 914a (*National Institute of Standards and Technology*)
- Solutions de contrôle de la qualité URN ASY CONTROL niveaux 2 et 3 (laboratoires Randox)

### 3.4.5. Solutions

Le dosage de la créatinine dans l'urine nécessite les solutions suivantes :

- Acide chlorhydrique 0,1 M : transvaser 871 µl d'acide chlorhydrique à 37 % dans une fiole jaugée de 100 ml. Compléter avec l'eau ultrapure jusqu'au volume nominal.
- Hydroxyde de sodium 0,3 M : dissoudre 3 g d'hydroxyde de sodium dans environ 100 ml d'eau ultrapure. Transvaser la solution dans une fiole jaugée de 250 ml, et compléter avec de l'eau ultrapure jusqu'au volume nominal.
- Solution de travail d'acide picrique : transvaser 10 ml de solution d'acide picrique à 1,2 % et 10 ml d'hydroxyde de sodium 0,3 M dans un tube en polypropylène de 50 ml. La solution de travail doit être préparée dans un endroit frais et à l'abri de la lumière.

### 3.4.6. Références d'étalonnage

Cette procédure opératoire standardisée requiert les normes d'étalonnage suivantes :

- Solution mère de créatinine (1 g/l) : verser 10 mg de Créatinine SRM 914a dans une fiole jaugée de 10 ml. Compléter avec de l'acide chlorhydrique 0,1 M jusqu'au volume nominal. Stocker à 4 °C pendant deux mois maximum.
- Solutions étalons : diluer la solution mère de créatinine avec de l'eau ultrapure dans des fioles jaugées de 10 ml, en suivant les indications du tableau 5. Stocker à 4 °C pendant une semaine maximum.

Tableau 5. Volume et concentrations pour la préparation des solutions étalons

Volume de solution mère de créatinine (µl)	Volume final de solution étalon (ml)	Concentration de solution étalon (g/l)	Concentration équivalente dans les échantillons d'urine (g/l)
40	10	0,004	0,2
80	10	0,008	0,4
200	10	0,020	1,0
400	10	0,040	2,0
800	10	0,080	4,0



### 3.5. Traitement et préparation des échantillons

Il convient de porter des gants sans poudre durant la manipulation des échantillons.

Les échantillons à analyser doivent être retirés du congélateur et réchauffés à température ambiante. Ils sont ensuite agités et centrifugés à 3 000 tours par minute pendant deux minutes. Chaque série d'analyses doit comprendre deux échantillons de concentration différente destinés au contrôle de la qualité et obtenus dans le commerce (Assayed Urine Chemistry Control niveau 2 et niveau 3). Chaque échantillon doit être reconstitué avec 10 ml d'eau bidistillée et reposer pendant 30 minutes à température ambiante avant son utilisation. Il peut être aliquoté et conservé à -20 °C pendant deux semaines.

Les échantillons d'analyse et les échantillons du contrôle de la qualité dilués à 1:50 sont préparés en trois réplicats. On introduit ensuite 20 µl de l'échantillon d'analyse ou de l'échantillon de contrôle dans des tubes de 1,5 ml à l'aide d'une pipette, auxquels on ajoute 980 µl d'eau ultrapure. On rebouche et on agite les tubes afin d'homogénéiser la dilution.

On verse ensuite 25 µl des échantillons étalons, des échantillons dilués et des échantillons de contrôle dans chacun des 96 puits de la microplaque, en respectant la répartition indiquée dans le tableau 6.

Tableau 6. Répartition des échantillons étalons, d'analyse et de contrôle sur la microplaque

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	eau	eau	eau	P1	P1	P1	P2	P2	P2	P3	P3	P3
<b>B</b>	P4	P4	P4	P5	P5	P5	S1	S1	S1	S2	S2	S2
<b>C</b>	S3	S3	S3	S4	S4	S4	S5	S5	S5	S6	S6	S6
<b>D</b>	S7	S7	S7	S8	S8	S8	S9	S9	S9	S10	S10	S10
<b>E</b>	S11	S11	S11	S12	S12	S12	S13	S13	S13	S14	S14	S14
<b>F</b>	S15	S15	S15	S16	S16	S16	S17	S17	S17	S18	S18	S18
<b>G</b>	S19	S19	S19	S20	S20	S20	S21	S21	S21	S22	S22	S22
<b>H</b>	S23	S23	S23	S24	S24	S24	C1	C1	C1	C2	C2	C2

*Notes:*

P1 : solution étalon de créatinine aqueuse 0,004 mg/ml

P2 : solution étalon de créatinine aqueuse 0,008 mg/ml

P3 : solution étalon de créatinine aqueuse 0,2 mg/ml

P4 : solution étalon de créatinine aqueuse 0,4 mg/ml

P5 : solution étalon de créatinine aqueuse 0,8 mg/ml

C1 : solution de contrôle de la qualité URN ASY CONTROL 2 diluée à 1:50

C2 : solution de contrôle de la qualité URN ASY CONTROL 3 diluée à 1:50

S1–S24 : échantillons dilués à 1:50.

La microplaque est fermée avec un couvercle et agitée sur un agitateur orbital à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 30 minutes. Elle est ensuite placée dans le lecteur, réglé sur 492 nm.

## 3.6. Procédure

### 3.6.1. Préparation du matériel d'analyse

Allumer le spectrophotomètre.

Compter environ 15 minutes de préchauffage avant de commencer l'analyse.

### 3.6.2. Mesure de l'échantillon

Mesurer les échantillons préparés selon les instructions du point 7.1 à 500 nm.

### 3.6.3. Calcul des résultats analytiques

Les résultats (mg de créatinine/ml) sont fournis directement par l'instrument en interpolant les relevés par rapport à la courbe d'étalonnage, en tenant compte du facteur de dilution des échantillons.

La valeur finale affichée correspond à la moyenne des trois mesures répliquées par échantillon. L'écart-type de ces mesures peut être calculé en fonction de la formule suivante.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (c_i - \bar{c})^2}{n-1}}$$

SD – standard deviation (écart-type)

$c_i$  – valeur individuelle

$\bar{c}$  – moyenne

n – nombre de déterminations

### 3.6.4. Plage de résultats mesurables

Il convient de vérifier que les valeurs d'analyse des échantillons du contrôle de la qualité satisfont aux critères des certificats d'analyse correspondants. Sinon, il faut recommencer l'analyse.

L'écart-type relatif des trois mesures effectuées pour chaque échantillon ne doit pas dépasser 5 %, sous peine de devoir effectuer le test de Grubbs, afin de déterminer si l'une des valeurs est aberrante.

$$Z = \frac{\text{Moyenne} - \text{Valeur escomptée}}{SD}$$

Z – valeur Z (pour évaluation selon le test de Grubbs) SD – écart-type

Si la valeur Z est supérieure à 1,15, elle peut être rejetée, et la concentration de l'échantillon peut être calculée comme la moyenne des deux valeurs restantes. Dans le cas contraire, l'échantillon doit être réanalysé.

Pour le dosage de la créatinine, la plage de valeurs mesurables est comprise entre 0,3 mg/ml et 3 mg/ml.

## 3.7. Contrôle de la qualité

La précision et l'exactitude des analyses de biomarqueurs effectuées par les laboratoires de toxicologie doivent être constamment vérifiées au moyen de procédures d'assurance de la qualité.

En général, l'assurance de la qualité dans les laboratoires de biologie médicale s'articule autour de contrôles internes et externes de la qualité, détaillés dans le *Programme de contrôle de la qualité pour la biosurveillance humaine du mercure*.

### 3.7.1. Contrôle interne de la qualité

L'assurance interne de la qualité vise à contrôler systématiquement la répétabilité, afin de détecter les erreurs aléatoires et de garantir l'exactitude des études quantitatives menées par les laboratoires.

Dans la pratique, la répétabilité est vérifiée au moyen d'un matériau de contrôle (matériau de référence), mesuré dans le cadre de chaque série d'analyses. Les résultats du contrôle interne de la qualité – de la journée ou d'un lot – sont saisis dans des graphiques de contrôle.

Si le matériau de contrôle (matériau de référence) n'est pas commercialisé, il est possible de le préparer en ajoutant une quantité fixe d'analyte (biomarqueur) dans un contingent de matériaux biologiques humains (sang, urine, etc.). Les aliquots prélevés sur ce contingent peuvent servir tant au contrôle interne de la qualité que dans le cadre de programmes de comparaison interlaboratoires. Il est établi que ces aliquots sont et restent homogènes, à condition d'être stockés et acheminés dans des conditions spécifiques, et que la concentration de l'analyte reste stable. Le matériau de contrôle doit couvrir tout le spectre des concentrations (faible, moyenne, élevée, par exemple), et les blancs.

Il est préférable de tester l'exactitude en utilisant un matériau de référence certifié, c'est-à-dire un matériau (biologique) contenant une concentration certifiée d'un ou plusieurs analytes. La certification s'effectue dans le cadre d'un programme, au cours duquel des laboratoires de pointe spécialisés dans l'analyse du biomarqueur en question procèdent au dosage du matériau de contrôle.

Une valeur certifiée est établie pour chaque analyte, à l'issue d'une procédure de validation par des experts et de procédures statistiques. Les matériaux de référence certifiés sont par conséquent onéreux, et ne doivent être utilisés qu'aux fins de validation ou de revalidation d'une méthode d'analyse.

### 3.7.2. Contrôle externe de la qualité

Le contrôle externe de la qualité constitue un moyen d'améliorer la comparabilité et l'exactitude des résultats analytiques. La comparabilité est un gage d'exactitude : elle permet de comparer les résultats analytiques entre laboratoires et avec les seuils correspondants.

La comparabilité et l'exactitude en matière de biosurveillance humaine sont nécessaires pour assurer l'égalité de la santé préventive, quel que soit le laboratoire d'analyses médicales concerné.

L'enquête de comparaison interlaboratoire constitue un moyen d'harmoniser les méthodes d'analyse et leur application et partant, d'améliorer la comparabilité des résultats analytiques.

À cet effet, il est possible d'utiliser des matériaux de contrôle (matériaux de référence). Les enquêtes de comparaison interlaboratoire sont nécessaires même si les laboratoires d'analyse appliquent la même procédure opératoire standardisée.

Le programme d'évaluation externe de la qualité constitue un moyen d'améliorer l'exactitude des résultats analytiques. À cet effet, l'analyse du matériau de contrôle s'effectue généralement dans des laboratoires de référence spécialisés dans l'analyse d'un biomarqueur particulier. C'est à partir des résultats obtenus par ces laboratoires de référence que sont déterminés les valeurs et les intervalles de tolérance pour chacun des biomarqueurs analysés. Les établissements participant à un tel programme reçoivent une certification pour les résultats s'inscrivant dans l'intervalle de tolérance.

Les matériaux de contrôle de la qualité utilisés dans cette procédure opératoire standardisée permettent d'évaluer l'exactitude et la précision du processus d'analyse, et de déterminer si les résultats produits par le système analytique sont suffisamment exacts et précis.

Les matériaux de référence utilisés pour le contrôle de la qualité des résultats analytiques sont URN ASY CONTROL 2 et 3 (laboratoires Randox).

Il convient de vérifier que les valeurs d'analyse des échantillons du contrôle de la qualité satisfont aux critères des certificats d'analyse correspondants. Sinon, il faut recommencer l'analyse.

Seules les mesures réalisées entre deux contrôles de la qualité dont les valeurs s'inscrivent dans la plage établie (valeur attribuée pour le matériau de référence  $\pm$  incertitude pour ce niveau) sont considérées comme valides.

Les contrôles externes de la qualité sont réalisés sous la forme de participation à des essais circulaires. À titre d'exemple, il est recommandé de participer régulièrement aux essais G-EQUAS (programme allemand d'évaluation de la qualité en externe) organisés par l'Institut et le centre de soins ambulatoires pour la médecine du travail, sociale et de l'environnement de la *Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg* (Allemagne).

## 3.8. Évaluation de la méthode

### 3.8.1. Linéarité

La linéarité d'une procédure analytique se définit comme la capacité (dans un intervalle donné) à obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration d'analyte présente dans l'échantillon. Ce paramètre est évalué en analysant des concentrations d'analyte de plus en plus élevées. Dans cette procédure opératoire standardisée, la linéarité de la méthode a été testée dans l'intervalle 0,004-0,08 mg/ml de créatinine.

Les données obtenues sont analysées statistiquement afin d'obtenir la courbe de régression, le coefficient de corrélation, le coefficient de détermination et le coefficient de linéarité. La courbe ainsi obtenue doit être linéaire, et son coefficient de détermination doit être supérieur à 0,999.

### 3.8.2. Précision

Il s'agit ici de mesurer la dispersion des résultats analytiques due à des erreurs aléatoires. La précision se traduit de manière statistique par un écart-type ou par un intervalle de confiance. Nous pouvons distinguer deux types de précision :

- la précision dans des conditions répétées (répétabilité) ; et
- la précision dans des conditions comparables (reproductibilité).

Les échantillons utilisés pour déterminer la précision s'inscrivaient dans l'intervalle 0,2-3 mg/ml. Le tableau 7 présente les résultats obtenus pour la répétabilité et la reproductibilité.

Tableau 7. Écart type maximal permis

Concentration (mg/ml)	RSD <sub>repet</sub>	RSD <sub>reprod</sub>
0,2	11,5	7,3
0,4	4,8	5,4
0,7	2,2	4,7
2,1	1,8	2,5
2,5	4,8	5,0

RSD<sub>repet</sub> – écart-type relatif pour la répétabilité

RSD<sub>reprod</sub> – écart-type relatif pour la reproductibilité

### 3.8.3. Exactitude

Il s'agit ici de mesurer l'écart entre la valeur mesurée et la valeur correcte (« juste ») dû à une erreur systématique. Il est possible de tester l'exactitude de la méthode en analysant les variables suivantes :

- l'organisation de tests de récupération (procédé par ajout connu) ;
- la participation à des enquêtes de comparabilité interlaboratoires dans lesquelles la valeur théorique est vérifiée par des laboratoires de référence agréés ;
- la comparaison de la procédure analytique à valider avec une procédure de référence certifiée, afin de déterminer le paramètre dans la matrice de prélèvement correspondante ;
- la comparaison des résultats analytiques pour un matériau de référence certifié avec la valeur de référence certifiée.

L'exactitude a été mesurée en ajoutant des quantités connues de créatinine dans les échantillons utilisés pour déterminer la précision. Le taux de récupération moyen obtenu se situait entre 98,2 % et 104,4 %.

La limite de quantification inférieure indique la quantité minimale d'analyte pouvant être dosée en appliquant une incertitude prédéfinie (généralement 33 %). La limite de quantification supérieure indique la quantité maximale d'analyte pouvant être dosée.

La limite de quantification doit être prise en compte dans la courbe d'étalonnage et peut être calculée à l'aide de plusieurs méthodes.

#### Calcul du ratio signal/bruit de fond

Le bruit de fond est calculé comme suit.

- L'intensité du bruit de fond ( $s_0$ ) est calculée en rapport avec l'analyte.
- La limite de détection est calculée comme étant trois fois supérieure à l'intensité moyenne du signal du bruit de fond ( $LDD = 3 \times s_0$ ).
- La limite de quantification est calculée comme étant neuf fois supérieure à l'intensité moyenne du signal du bruit de fond ( $LDQ = 9 \times s_0$ ).

#### Autres procédures

Il convient de noter que les valeurs à blanc des échantillons d'origine influent sur le choix de la méthode et de l'approche :

- procédure de l'écart-type (selon EURACHEM)
- procédure de la valeur à blanc (selon DIN 32 645)
- procédure de la courbe d'étalonnage (selon DIN 32 645).

Dans cette procédure opératoire standardisée, la limite de quantification a été calculée en utilisant la procédure de la courbe d'étalonnage, et le résultat obtenu correspond à la valeur la plus faible de cette courbe, soit 0,004 mg/ml de créatinine.

## 3.9. Sources d'erreur

Cette méthode d'analyse repose sur la technique colorimétrique de la réaction de Jaffé (19), dans laquelle la substance active du méthylène de la créatinine réagit avec l'atome C3 de l'acide picrique (20, 21) pour former un produit de réaction coloré (19, 21). Toutefois, cette réaction colorée entre l'acide picrique et la créatinine n'est pas spécifique à cette substance. En règle générale, les composés réducteurs ou les composés contenant du méthylène activé par  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{CONH}_2$ ,  $-\text{CH}_2=\text{CH}_2$ -,  $-\text{COOR}$  ou  $-\text{N}=\text{N}-$ , peuvent également donner lieu à la formation de produits colorés. Par conséquent, aucune réaction perturbatrice n'est causée par le glucose, le fructose, le maltose,

l'hydroxylamine ou l'acide ascorbique, tandis que l'acétone, l'acide  $\gamma$ -aminolévulinique et l'acide aminooxyacétique produisent une réaction colorée en présence d'acide picrique (22).

Le dosage des chromogènes précités dans l'urine étant très faible (20), la perturbation qu'ils engendrent peut être considérée comme négligeable. Par exemple, le dosage d'acide  $\gamma$ -aminolévulinique dans l'urine est de 100 à 1000 fois inférieur environ à celui de la créatinine.

La solution d'acide picrique est photosensible et doit donc être conservée à l'abri de la lumière, de même que la microplaque préparée durant l'incubation.

Il faut faire attention à ne provoquer aucune éclaboussure avec les pipettes utilisées pour déposer les solutions sur la microplaque, ce qui entraînerait la contamination des autres échantillons. Afin d'éviter ce type d'incident, il est conseillé de déposer la solution d'acide picrique à l'aide d'un distributeur manuel mobile.

La présence d'impuretés (traces de doigts, etc.) sur le dessous de la microplaque risque de perturber considérablement le travail de mesure. Dans le pire des cas, l'appareil de mesure ne pourra pas lire la plaque. Le dessous de celle-ci doit donc rester propre et être nettoyé avec un chiffon imbibé d'éthanol avant toute prise de mesure.

### 3.10. Autre méthode : détermination de la densité relative dans les échantillons d'urine

Une autre méthode de dosage de la créatinine consiste à calculer la densité relative des échantillons d'urine, afin de normaliser la teneur en mercure en fonction des écarts de dilution de l'urine entre les sujets (23). Cette méthode est employée dans de nombreuses études de biosurveillance humaine. La densité relative est calculée dans une goutte d'urine au moyen d'un réfractomètre, un petit appareil à l'utilisation très simple. La procédure suivante s'applique au réfractomètre PAL-10S (Atago, Japon), mais convient également à tout instrument similaire.

Le matériel nécessaire est le suivant :

- Réfractomètre (par ex., le modèle PAL-10S, Atago, Japon)
- Flacons de prélèvement d'urine (on peut utiliser les mêmes que pour le dosage du mercure)
- Pipette (0,1-1 ml)
- Eau distillée
- Chiffon propre ou serviettes jetables
- Gants

La procédure de détermination de la densité relative dans les échantillons d'urine est la suivante :

1. La température de l'eau distillée utilisée pour l'étalonnage (à zéro) et de l'échantillon doit être la même que la température ambiante.
2. Étalonner le réfractomètre en déposant de l'eau distillée (environ 0,3 ml) sur le prisme et appuyer sur le bouton DÉMARRER. Si l'écran affiche « 1,000 », il est inutile d'effectuer le réglage sur zéro. Si l'écran affiche une autre valeur que « 1,000 », appuyer sur le bouton ZÉRO en laissant l'eau sur le prisme. Le réglage sur zéro est effectué lorsque « 000 » s'affiche sur l'écran. Essuyer le prisme à l'aide d'un chiffon doux et non abrasif. Afin de rester exact, l'étalonnage doit être effectué avant l'analyse et tous les dix échantillons environ.
3. Mesure. Nettoyer le prisme à l'eau distillée et sécher la surface avec un chiffon doux et non abrasif. Déposer une goutte d'urine (environ 0,3 ml) sur la surface du prisme. Appuyer sur le bouton DÉMARRER. La valeur de mesure s'affiche sur l'écran. Essuyer le prisme avec un chiffon doux. Si besoin, enlever le reste de l'échantillon avec de l'eau distillée. Sécher la surface avec un chiffon propre et sec. Pour éteindre l'appareil, appuyer sur le bouton DÉMARRER pendant environ deux secondes.

4. Calcul. La densité relative moyenne généralement utilisée aux fins de la normalisation est de 1,013 pour les femmes et de 1,019 pour les hommes. Les calculs sont décrits dans la littérature (24).

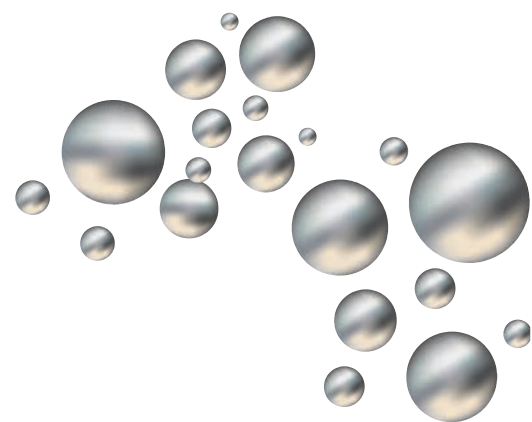
$$U_{biomarker}/SG = U_{biomarker} * \frac{(SG_{std} - 1)}{(SG_{ob} - 1)}$$

$U_{biomarker}$  – niveau de la substance (par ex., mercure) dosée dans l'urine

$SG_{ob}$  – densité relative, observée

$SG_{std}$  – densité relative moyenne au sein de la population étudiée

La densité relative obtenue se situe généralement entre 1,000 (l'équivalent de celle de l'eau) et 1,035 (forte déshydratation), voire plus.



## 4. Interprétation des résultats

La teneur en mercure urinaire – le meilleur indicateur de la concentration de mercure dans les reins selon les scientifiques – est généralement considérée comme la mesure la plus fiable de l'exposition récente aux vapeurs de mercure inorganique ou élémentaire (25). Toutefois, le mercure inorganique s'accumule dans les reins et son excrétion par l'urine est lente, si bien que la quantité de mercure présente dans l'urine peut indiquer une exposition ancienne au mercure élémentaire et/ou inorganique (3).

On a constaté que les concentrations en mercure élémentaire présentes dans l'air inhalé et dans les urines étaient très corrélées, à des niveaux de concentration intermédiaires et élevés. La concentration maximale du mercure urinaire fixée par l'OMS (26) s'élève à 50 µg/g de créatinine. La quantité de mercure présente dans l'urine dépasse rarement 5 µg/g de créatinine chez les personnes non exposées professionnellement au mercure (3).

Des concentrations de mercure excédant 20 µg/l d'urine ont été détectées chez des mineurs, qui chauffent souvent des amalgames d'or et de mercure dans des contenants ouverts. Des concentrations de mercure encore plus élevées (jusqu'à 1168 µg/l) ont été signalées chez des employés de vendeurs d'or dans des villages d'Amazonie, qui travaillent dans des environnements confinés contrairement aux mineurs manipulant les amalgames. À Alta Floresta, dans l'État du Mato Grosso, au Brésil, la teneur en mercure de l'urine des employés des vendeurs d'or (qui font fondre l'or dans des hottes aspirantes sans masque) excédait 20 µg/l chez au moins 13 des 17 employés examinés (27).

En Allemagne, la Human Biomonitoring Commission applique une valeur de référence de 1 µg/l d'urine (28) chez les adultes n'ayant pas d'amalgames dentaires. La valeur de référence correspondante pour les enfants n'ayant pas d'amalgames dentaires est 0,4 µg/l (28). La valeur indicative HBM-I basée sur l'approche du risque sanitaire atteint 7 µg/l ou 5 µg/g de créatinine. Dans la plupart des pays, la moyenne géométrique chez les adultes est inférieure à la valeur de référence (8).



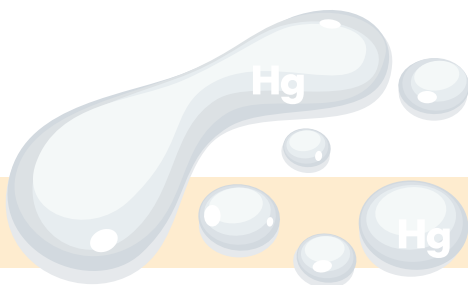
# Références

1. Mercure et santé [principaux repères], Genève, Organisation mondiale de la Santé, 2017 (<https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/mercury-and-health>, consulté le 16 juillet 2018).
2. Health effects of exposure to mercury [web page]. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency; 2017 ([www.epa.gov/mercury/health-effects-exposures-mercury](http://www.epa.gov/mercury/health-effects-exposures-mercury), accessed 11 December 2017).
3. Guidance for identifying populations at risk from mercury exposure. Geneva: United Nations Environment Programme and World Health Organization; 2008 ([www.who.int/foodsafety/publications/chem/mercuryexposure.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/mercuryexposure.pdf), accessed 11 December 2017).
4. Promoting the phase down of dental amalgam in developing countries. Geneva: United Nations Environment Programme and World Health Organization; 2014 ([https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/13865/dental\\_mercury\\_phase\\_down\\_project\\_brochure\\_FINAL\\_lr.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/13865/dental_mercury_phase_down_project_brochure_FINAL_lr.pdf?sequence=1&isAllowed=y), 11 December 2017).
5. Le mercure dans les produits éclaircissants pour la peau [note d'information de l'OMS], Genève, Organisation mondiale de la Santé, 2011 ([https://www.who.int/ipcs/assessment/public\\_health/mercury\\_flyer\\_fr.pdf?ua=1](https://www.who.int/ipcs/assessment/public_health/mercury_flyer_fr.pdf?ua=1), consulté le 19 juillet 2019).
6. Biomonitoring-based indicators of exposure to chemical pollutants. Report of a meeting, Catania, Italy, 19–20 April 2012. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2012 ([http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0004/170734/e96640.pdf?ua=1](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0004/170734/e96640.pdf?ua=1), accessed 11 December 2017).
7. Second Extraordinary Meeting of the European Environment and Health Task Force (EHTF). Meeting report. The Hague, Netherlands, 31 May–1 June 2012. Copenhagen: World Health Organization; 2012 ([http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0006/186027/e96820.pdf](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0006/186027/e96820.pdf), accessed 11 December 2017).
8. Human biomonitoring: facts and figures. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2015 (<http://www.euro.who.int/en/media-centre/events/events/2015/04/ehp-mid-term-review/publications/human-biomonitoring-facts-and-figures>, accessed 11 December 2017).
9. Barr D. B., Wilder L. C., Caudill S. P., Gonzalez A. J., Needham L. L., Pirkle J. L., Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: implications for urinary biologic monitoring measurements, *Environmental Health Perspectives*, 2005, 113(2), p. 192-200 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1277864/>, accessed 11 December 2017).
10. Nuttall K. L., Interpreting mercury in blood and urine of individual patients, *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 2004, 34(3), p. 235-250 (<http://www.annclinlabsci.org/content/36/3/248.full.pdf+html>, accessed 31 January 2018).
11. Aitio A., Järvisalo J., Kiilunen M., Tossavainen A., Vaittinen P., Urinary excretion of chromium as an indicator of exposure to trivalent chromium sulphate in leather tanning, *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 1984, 54(3), p. 241-249 (<https://link.springer.com/article/10.1007/BF00379053>, accessed 31 January 2018).
12. Akagi H., Analytical methods for evaluating human exposure to mercury due to gold mining, in *Proceedings of the International Workshop on Health and Environmental Effects of Mercury due to Mining Operations*, Manila, 26–27 November 1997, Minamata, National Institute for Minamata Disease, 1998, p. 113-141.



13. Horvat M., Gibičar D., Speciation of mercury: environment, food, clinical, and occupational health, in Cornelis R., Caruso J., Crews H., Heumann K., (dir.), Handbook of elemental speciation II: species in the environment, food, medicine and occupational health, Chichester, John Wiley & Sons, 2005, p. 281-304.
14. Horvat M., Snoj Tratnik J., Miklavčič A., Mercury: biomarkers of exposure and human biomonitoring, in Knudsen L., Merlo D. F., (dir.), Biomarkers and human biomonitoring. Volume 1. Ongoing programs and exposures, Cambridge, Royal Society of Chemistry, 2011, p. 381-417.
15. ISO/IEC 17025:2005 Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais, Genève, Organisation internationale de normalisation, 2005 (<https://www.iso.org/fr/standard/39883.html>, consulté le 19 juillet 2019).
16. Ellison S. L. R., Williams A., (dir.), Guide EURACHEM / CITAC : Quantifier l'incertitude des mesures analytiques - 3e édition, 2012 (<https://www.lne.fr/fr/guides-techniques/guide-eurachem-citac>, consulté le 19 juillet 2019).
17. Weihrauch M., Schulze B., Schaller K. H., Lehnert G., Kreatinin als Bezugsgröße für Stoffkonzentrationen in harn in Drexler H., Greim H., (dir.), Biologische Arbeitsstößtoleranz-werte (BAT-Werte). Expositionsäquivalente für krebserzeugende Arbeitsstoffe (EKA) und biologische leitwerte (BLW), Deutsche Forschungsgemeinschaft-Arbeitsmedizinischtoxikologische begründungen, Spezielle Vorbemerkungen vol 1., n° 9, Wiley-VCH, 2000, p. 21-31.
18. Kommission Humanbiomonitoring des Umweltbundesamtes: Normierung von Stoffgehalten in urin-kreatinin, Bundesgesundheitsblatt, 2005, p. 616-618.
19. Jaffé M., Über den Niederschlag welchen Pikrinsäure in normalen Harn erzeugt und über eine neue reaction des Kreatinins, Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie, 1886, 10, p. 391-400.
20. Butler A. R., The Jaffé reaction. Identification of the coloured species, Clinica Chimica Acta, 1975, 59, p. 227-232 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0009898175900339?via%3Dihub>, accessed 31 January 2018).
21. Kakac B., Vejdelek Z. J., Handbuch der photometrischen analyse organischer Verbindungen. 2nd supplementary volume. Reaction mit 2,4,6-trinitrophenol (Pikrinsäure) und alkaline (basen), Weinheim, Verlag-Chemie, 1983, p. 113-114.
22. Kakac B., Vejdelek Z. J., Handbuch der photometrischen analyse organischer Verbindungen. Reaction mit 2,4,6-trinitrophenol (Pikrinsäure), Weinheim, Verlag-Chemie, 1974, p. 275-276.
23. Stajniko A., Falnoga I., Snoj Tratnik J., Mazej D., Jagodic M., Krsnik M. et al., Low cadmium exposure in males and lactating females—estimation of biomarkers, Environmental Research, 2017, 152, p. 109-119 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013935116307009?via%3Dihub>, accessed 31 January 2018).
24. Suwazono Y., Åkesson A., Alfvén T., Järup L., Vahter M., Creatinine versus specific gravity adjusted urinary cadmium concentration, Biomarkers, 2005, 10, p. 117-126 (<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13547500500159001?journalCode=ibmk20>, accessed 31 January 2018).
25. Clarkson T. W., Hursh J. B., Sager P. R., Syversen T. L. M., Mercury, in Clarkson T. W., Friberg L., Nordberg G. F., Sager P. R., (dir.), Biological monitoring of toxic metals, New York, Plenum Press, 1988, p. 199-246.
26. Guidelines for methylmercury in fish. Report of a Joint FAO/NACA/WHO study group on food safety issues associated with products from aquaculture. WHO Technical Report Series 883. Geneva: World Health Organization; 1999

27. Veiga M. M., Baker R. F., Protocols for environmental and health assessment of mercury released by artisanal and small-scale gold miners. Vienna: United Nations Industrial Development Organization; 2004.
28. Schulz C., Wilhelm M., Heudorf U., Kolossa-Gehring M., Update of the reference and HBM values derived by the German Human Biomonitoring Commission, International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2011, 215(1), p. 26-35 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438463911000794?via%3Dihub>, accessed 31 January 2018).



## Annexe 1. Instructions à l'intention des participantes au prélèvement d'urine

Veillez lire attentivement ces instructions avant de recueillir les premières urines du matin.

**Remarque.** La dernière miction doit remonter à au moins cinq heures.



1. Rentrez dans les toilettes.
2. Lavez-vous les mains à l'eau et au savon, et séchez-les.
3. Retirez le flacon de prélèvement d'urine du sac refermable en plastique (utilisez uniquement le flacon fourni. Celui-ci a été prétraité en vue de cette enquête.)
4. Ouvrez le flacon en dévissant le couvercle.
5. Recueillez vos premières urines du matin dans le flacon en le remplissant jusqu'au trait.
6. Revissez bien le couvercle.
7. Remettez le flacon d'urine dans le sac refermable en plastique.
8. Conservez l'échantillon à une température comprise entre 4°C et 8°C jusqu'à sa remise au personnel de santé (dans les 24 heures au maximum).

Nous vous remercions de votre participation.

## Annexe 2. Questionnaire à remplir lors du prélèvement d'urine

Nom de la mère	
Numéro de dossier médical	
ID d'étude de la mère	
Collaborateur médical	Signature : Nom en caractères d'imprimerie :
1. Ces urines ont-elles été recueillies le matin ?	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
2. . Date et heure du prélèvement	-----/-----/-----/ (jour/mois/année) Début : -----/----- (heure/minute)
3. Combien d'heures avant le prélèvement de l'échantillon avez-vous uriné pour la dernière fois ?	__ heures
4. Combien d'heures avant le prélèvement de l'échantillon avez-vous pris votre dernier repas ?	__ heures
5. À quand remonte votre dernière consommation de poisson ou d'autres produits de la mer avant le prélèvement de l'échantillon ?	<input type="checkbox"/> Aujourd'hui <input type="checkbox"/> Hier <input type="checkbox"/> Avant-hier

## Annexe 3. Liste de contrôle à remplir à la réception de l'échantillon

Volume	Urine			Aliquotage des échantillons d'urine		
	U1	U2	X U			
	Mercure		Créatinine			Biobanque
	 5 ml	5 ml 	x 40 ml o x 10 ml			
Température de stockage (sur site et pendant le transport)	Boîte de refroidissement	Boîte de refroidissement	Boîte de refroidissement			
Température de stockage (laboratoire)	-20 °C	-20 °C	-80 °C			
<b>Numéro d'identification</b>				Date	heure	
ID						
ID						
ID						
....						

# Procédure opératoire standardisée pour le dosage du mercure présent dans les cheveux, le sang ombilical et l'urine à l'aide d'une autre méthode

## Résumé

Les procédures opératoires standardisées parallèles décrites ci-après sont destinées aux laboratoires ayant accès à des instruments d'analyse par injection en flux continu et d'amalgamation avec l'or suivie d'une détection par spectrométrie d'absorption atomique de vapeur froide (SAAVF) ou par spectroscopie à fluorescence atomique de vapeur froide (SFAVF). La présente procédure opératoire standardisée décrit la procédure de digestion. Le mercure présent dans les échantillons digérés peut ensuite être déterminé grâce à une procédure d'injection en flux continu, ou à une amalgamation avec l'or avec SFAVF (ou SAAVF).

## Mots-clés

Mercure - analyse  
Composés du méthylmercure – analyse  
Sang foetal – chimie  
Cordon ombilical – chimie  
Cheveux - chimie  
Urine - chimie  
Biomarqueurs - analyse  
Analyse par injection en flux  
Spectrophotométrie atomique  
Exposition environnementale

## Contributeurs

Milena Horvat  
Jožef Stefan Institute, Ljubljana (Slovénie)  
Janja Snoj Tratnik  
Jožef Stefan Institute, Ljubljana (Slovénie)  
Vesna Fajon  
Jožef Stefan Institute, Ljubljana (Slovénie)

# Table des matières

<b>Abréviations .....</b>	<b>140</b>
<b>1. Digestion acide des échantillons biologiques .....</b>	<b>141</b>
1.1. Portée de la méthode .....	141
1.2. Principe technique.....	141
1.3. Précautions nécessaires .....	141
1.4. Digestion de matières biologiques .....	141
<b>2. Dosage du mercure par injection en flux continu et détection par spectrométrie d'absorption atomique de vapeur froide .....</b>	<b>144</b>
2.1. Principe et application.....	144
2.2. Équipement, matériel et solutions .....	144
2.3. Analyse par spectrométrie d'absorption atomique de vapeur froide .....	147
<b>3. Dosage du mercure par double amalgamation avec l'or et détection par spectrométrie à fluorescence atomique de vapeur froide .....</b>	<b>150</b>
3.1. Principe de la méthode.....	150
3.2. Équipement, matériel et solutions .....	150
3.3. Procédure analytique .....	153
3.4. Calcul .....	156

# Abréviations

BrCl	Chlorure de brome
HCl	Acide chlorhydrique
HgCl <sub>2</sub>	Chlorure de mercure
HNO <sub>3</sub>	Acide nitrique
KBr	Bromure de potassium
KBrO <sub>3</sub>	Bromate de potassium
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Dichromate de potassium
KMnO <sub>4</sub>	Permanganate de potassium
p/v	Poids/volume
SnCl <sub>2</sub>	Chlorure d'étain
SAAVF	Spectrométrie d'absorption atomique de vapeur froide
SFAVF	Spectrométrie à fluorescence atomique de vapeur froide
V <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Pentoxyde de vanadium
vol/vol	Volume/volume



# 1. Digestion acide des échantillons biologiques

## 1.1 Portée de la méthode

La méthode décrite ci-après est destinée à évaluer le dosage du mercure (Hg) dans les échantillons biologiques.

## 1.2. Principe technique

La présente méthode s'applique à tous les échantillons biologiques dont les concentrations en mercure dépassent 1 ng/g. La digestion à l'acide fort a pour objectif de décomposer les échantillons et d'oxyder et de transformer toute forme organique de mercure en mercure inorganique.

## 1.3. Précautions nécessaires

Respecter les mesures de précaution universelles. Porter des gants, une blouse de laboratoire et des lunettes de protection lors de la manipulation de sang humain, de plasma, de sérum, d'urine ou d'autres tissus ou liquides biologiques. Placer les éléments jetables en plastique, en verre et en papier (embouts de pipettes, tubes d'échantillonneur automatique, gants, etc.) ayant été en contact avec des liquides biologiques, tels que l'urine, dans un sac à autoclave pour déchets à risque biologique. Conserver ces sacs dans des flacons adaptés jusqu'à ce qu'ils soient fermés et autoclavés.

Une fois le travail terminé, il convient de frotter toutes les surfaces de travail sur lesquelles a été effectuée la manipulation des liquides biologiques avec une solution d'hypochlorite de sodium à 10 % (pourcentage volumique) ou équivalent. Il est recommandé d'utiliser la pédale du Micromedic Digiflex™ car elle réduit les contacts avec les surfaces de travail sur lesquelles il y a eu des liquides biologiques, et permet à l'analyste d'utiliser ses mains pour manipuler les contenants des échantillons et les tubes d'échantillonneur automatique. Les échantillons biologiques et les échantillons dilués doivent être jetés dans un sac à autoclave pour déchets à risque biologique à la fin de l'analyse, conformément aux directives relatives à l'élimination des déchets dangereux.

## 1.4. Digestion de matières biologiques

### 1.4.1. Équipement

- Bouteille en verre d'un litre nettoyée selon la procédure de nettoyage du verre.
- Fiole jaugée de 500 ml (classe A) nettoyée selon la procédure de nettoyage du verre.
- Fioles en Téflon avec capuchons (60 ml) nettoyées selon la procédure de nettoyage du Téflon.
- Spatules en polypropylène.
- Plaque chauffante et bloc d'aluminium.
- Balance de précision.

### 1.4.2. Nettoyage du verre

Avant toute utilisation, il convient de nettoyer soigneusement tous les articles de laboratoire en verre comme suit.

- Faire tremper les flacons en Téflon et en verre une nuit dans une solution de nettoyant Micro-90 à 2 %.
- Rincer abondamment les flacons une première fois à l'eau du robinet, et une seconde fois à l'eau bidistillée.

- Rincer avec une solution de permanganate de potassium ( $\text{KMnO}_4$ ) à 0,5 %.
- Rincer ensuite à l'eau jusqu'à ce que la couleur de la solution de  $\text{KMnO}_4$  ne soit plus visible.
- Remplir les flacons d'une solution d'acide chlorhydrique ( $\text{HCl}$ ) à 1 % et les stocker dans un emplacement exempt de mercure.
- Vider les flacons juste avant de les utiliser pour traiter les échantillons, et les faire sécher à  $60^\circ\text{C}$  dans une hotte à flux.

### 1.4.3. Nettoyage du Téflon

- Faire tremper les flacons une nuit dans un contenant en plastique avec une solution savonneuse (solution de Micro à 2 % dans de l'eau du robinet).
- Rincer abondamment une première fois à l'eau du robinet, et une seconde fois à l'eau bidistillée.
- Mettre les flacons dans une solution d'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ) concentré à 50 % (vol/vol) et faire chauffer à  $60^\circ\text{C}$  pendant deux jours.
- Rincer abondamment à l'eau bidistillée (au moins quatre fois).
- Mettre les flacons dans une solution de  $\text{HCl}$  concentré à 10 % (vol/vol) pendant une journée (au moins) à température ambiante.
- Rincer abondamment à l'eau bidistillée (au moins quatre fois).
- Stocker tous les flacons dans des sachets en polyéthylène. Si possible (en particulier pour les bouteilles en Téflon et en verre), remplir les flacons de  $\text{HCl}$  à 1 %.

### 1.4.4. Réactifs et produits chimiques

- $\text{HNO}_3$  (65 %, qualité analytique, faible en mercure)
- $\text{HCl}$  (30 %)
- Pentoxyde de vanadium  $\text{V}_2\text{O}_5$  (extra pur)
- Dichromate de potassium ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ )
- Bromate de potassium ( $\text{KBrO}_3$ ) (qualité analytique)
- Bromure de potassium ( $\text{KBr}$ ) (qualité analytique)
- Eau déionisée bidistillée (>18 MQ cm)

Il existe deux options de solutions oxydantes.

#### **$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 10 % (poids/volume [p/v]) dans de l'eau bidistillée**

1. Mettre 50 g de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  dans une fiole jaugée en verre propre de 500 ml.
2. Ajouter environ 250 ml d'eau bidistillée et agiter jusqu'à la dissolution du  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ .
3. Remplir d'eau bidistillée jusqu'à la graduation.

#### **Solution oxydante $\text{BrCl}$**

1. Mettre précisément 11 g de  $\text{KBrO}_3$  et 15 g de  $\text{KBr}$  dans une bouteille en verre propre d'un litre.
2. Ajouter 200 ml d'eau bidistillée.
3. Ajouter soigneusement 800 ml de  $\text{HCl}$  concentré ; la dilution doit se faire dans une hotte bien aérée pour éviter toute exposition aux émanations toxiques libérées pendant la dissolution du  $\text{KBrO}_3$ .
4. Envelopper la bouteille dans du papier aluminium.

Ces deux solutions peuvent être conservées à l'infini à condition d'être stockées dans un lieu exempt de mercure, à l'abri de la lumière et à température ambiante, dans une bouteille en Téflon ou en verre hermétiquement fermée.

### 1.4.5. Procédure

1. Agiter les fioles contenant les échantillons pendant environ deux minutes pour les homogénéiser.
2. Attendre quelques minutes avant d'ouvrir les fioles.
3. Peser précisément de 0,5 ml à 1 ml d'échantillon sanguin, de 20 mg à 100 mg d'échantillon de cheveux ou de 1 ml à 2 ml d'échantillon d'urine dans des fioles en Téflon (60 ml).
4. Mettre 45 mg de  $V_2O_5$  dans ces fioles.
5. Ajouter 5 ml de  $HNO_3$  concentré (ou plus si nécessaire ; le mélange doit être liquide).
6. Refermer les couvercles et laisser reposer les fioles pendant au moins une heure à température ambiante. Si la réaction est très forte, il peut être plus prudent de laisser les échantillons reposer à température ambiante toute la nuit avant de les chauffer.
7. Mettre les tubes dans un bloc d'aluminium sur une plaque chauffante à  $90^\circ C$  pendant 3 heures.
8. Laisser les échantillons refroidir jusqu'à température ambiante avant d'ouvrir les tubes. Laisser les tubes refroidir dans une hotte pour éviter les émanations acides toxiques.
9. Ajouter environ 20 ml d'eau bidistillée.
10. Ajouter 1 ml de solution de  $K_2Cr_2O_7$  (concentration finale = 2 % vol/vol), ou 0,5 ml de solution de  $BrCl$  (concentration finale = 1 % vol/vol).
11. Diluer jusqu'à la graduation avec de l'eau bidistillée (volume de dilution = 57,5 ml).
12. Agiter les fioles et attendre la sédimentation de la matière avant de procéder à l'analyse.

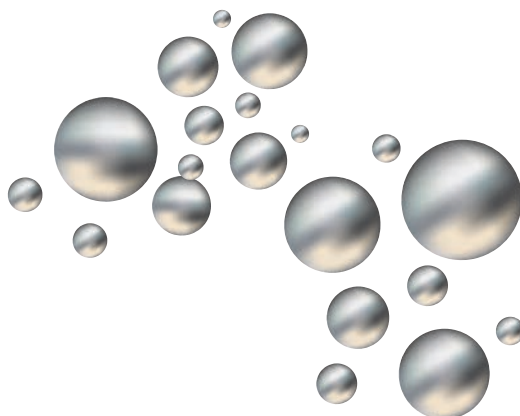
Ces échantillons peuvent être conservés quelques jours avant l'analyse à condition d'être placés au réfrigérateur (+ 4 °C). La durée maximale de stockage doit être déterminée selon l'expérience pour chaque type d'échantillon.

### 1.4.6. Blancs de réactifs

Il convient de préparer au moins trois blancs pour chaque lot d'analyse. Le processus de préparation est semblable à celui des échantillons, la seule différence étant qu'il ne faut pas ajouter d'échantillon dans les tubes de digestion.

### 1.4.7. Matériaux de référence

Il convient d'utiliser au moins un matériau de référence certifié et d'en préparer trois répliquats pour chaque lot d'analyse. Ces digestions se préparent de la même façon que les échantillons. Le matériau de référence certifié doit avoir une composition et une concentration en mercure comparables à celles des échantillons.



## 2. Dosage du mercure par injection en flux continu et détection par spectrométrie d'absorption atomique de vapeur froide

### 2.1. Principe et application

Les échantillons biologiques sont minéralisés aux acides forts. Le mercure inorganique est réduit à sa forme élémentaire avec du chlorure d'étain selon un principe d'injection en flux continu. La vapeur froide de mercure est séparée des échantillons digérés dans un séparateur gaz-liquide et passe ensuite par la cellule d'absorption en quartz d'un spectrophotomètre d'absorption atomique, où sa concentration est évaluée. Le faisceau lumineux de la lampe Hg à cathode creuse est orienté vers la cellule en quartz et passe par un monochromateur, puis par un détecteur qui mesure la quantité de lumière absorbée par la vapeur atomisée dans la cellule. La quantité d'énergie absorbée à la longueur d'onde caractéristique est proportionnée à la concentration de l'élément dans l'échantillon.

### 2.2. Équipement, matériel et solutions

#### 2.2.1. Équipement

Spectrophotomètre d'absorption atomique SpectrAA-10 Varian et générateur de vapeur VGA-76 ou tout système équivalent fondé sur le principe d'injection en flux continu.

#### 2.2.2. Matériel

- Micropipettes
- Bouteilles en Téflon de 125 ml nettoyées selon la procédure de nettoyage du Téflon
- Balance de précision
- Fioles jaugées de 50 ml à 1000 ml en verre (classe A), nettoyées selon la procédure de nettoyage du verre.

#### 2.2.3. Nettoyage du verre

Avant toute utilisation, il convient de nettoyer soigneusement tous les articles de laboratoire en verre comme suit.

- Faire tremper les flacons en Téflon et en verre une nuit dans une solution de nettoyant Micro-90 à 2 %.
- Rincer abondamment les flacons une première fois à l'eau du robinet, et une seconde fois à l'eau bidistillée.
- Rincer à l'aide d'une solution de  $\text{KMnO}_4$  à 0,5 %.
- Rincer ensuite à l'eau jusqu'à ce que la couleur de la solution de  $\text{KMnO}_4$  ne soit plus visible.
- Remplir les flacons d'une solution de HCl 1 % et les stocker dans un emplacement exempt de mercure.
- Vider les flacons juste avant de traiter les échantillons, et les laisser sécher à 60°C dans une hotte à flux.

### 2.2.4. Nettoyage du Téflon

- Faire tremper les flacons une nuit dans un contenant en plastique avec une solution savonneuse (solution Micro à 2 % dans de l'eau du robinet).
- Rincer abondamment une première fois à l'eau du robinet, et une seconde fois à l'eau bidistillée.
- Mettre les flacons dans une solution concentrée de  $\text{HNO}_3$  à 50 % (vol/vol) et faire chauffer à  $60^\circ\text{C}$  pendant deux jours.
- Rincer abondamment à l'eau bidistillée (au moins quatre fois).
- Mettre les flacons dans une solution de  $\text{HCl}$  concentré à 10 % (vol/vol) pendant une journée (au moins) à température ambiante.
- Rincer abondamment à l'eau bidistillée (au moins quatre fois).
- Stocker tous les flacons dans des sachets en polyéthylène. Si possible (en particulier pour les bouteilles en Téflon et en verre), remplir les flacons de  $\text{HCl}$  à 1 %.

### 2.2.5. Réactifs et produits chimiques

- $\text{HNO}_3$  (65 %, qualité analytique, faible en mercure)
- $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (qualité analytique, faible en mercure)
- $\text{KBr}$
- $\text{KBrO}_3$
- Chlorure d'étain ( $\text{SnCl}_2$ ) (qualité analytique, normal ou faible en mercure)
- $\text{HCl}$  (30 %)
- Chlorure de mercure ( $\text{HgCl}_2$ ) (sel) ou solution de mercure standard (1000 mg/l)
- Eau déionisée bidistillée (>18 MQ cm)
- Argon (qualité pure)

### 2.2.6. Solutions de réactifs

*$\text{SnCl}_2$  à 20 % p/v dans  $\text{HCl}$  à 20 % vol/vol (200 ml)*

1. Mettre précisément 40 g de  $\text{SnCl}_2$  dans un bécher en verre propre avec une spatule en plastique (le bécher et la spatule ne sont utilisés que pour le  $\text{SnCl}_2$ ).
2. Ajouter 40 ml de  $\text{HCl}$  concentré directement dans le  $\text{SnCl}_2$  et transvaser dans une fiole jaugée de 200 ml. Mélanger et attendre que le  $\text{SnCl}_2$  soit complètement dissous.
3. Ajouter de l'eau bidistillée jusqu'à la graduation (200 ml).
4. Avec une solution mère plus ancienne de  $\text{SnCl}_2$ , il peut être nécessaire de réchauffer la solution sur une plaque chauffante pour parvenir à la dissolution complète du  $\text{SnCl}_2$  (ne pas porter à ébullition).
5. En cas d'échantillons à faible concentration, si le  $\text{SnCl}_2$  utilisé n'est pas « faible en Hg », il doit être purgé à l'azote pendant deux heures avant d'être utilisé.
6. Il convient de préparer une nouvelle solution pour chaque jour d'analyse.

Remarque : tous les éléments en verre utilisés pour préparer la solution de  $\text{SnCl}_2$  doivent être séparés des autres instruments de laboratoire pour éviter toute contamination croisée des outils utilisés pour évaluer les éléments traces.

*HNO<sub>3</sub> à 10 % vol/vol (500 ml)*

1. Mettre environ 400 ml d'eau bidistillée dans une fiole jaugée de 500 ml.
2. Ajouter soigneusement 50 ml de HNO<sub>3</sub> concentré.
3. Remplir d'eau bidistillée jusqu'à la graduation.
4. Agiter vigoureusement.

Cette solution peut être conservée à condition d'être stockée dans un flacon hermétiquement fermé. Il existe deux options de solutions oxydantes.

*K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> à 10 % (p/v) dans de l'eau bidistillée*

1. Mettre 50 g de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> dans une fiole jaugée en verre propre de 500 ml.
2. Ajouter environ 250 ml d'eau bidistillée et agiter jusqu'à la dissolution du K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.
3. Remplir d'eau bidistillée jusqu'à la graduation.

*Solution oxydante BrCl*

1. Mettre précisément 11 g de KBrO<sub>3</sub> et 15 g de KBr dans une bouteille en verre propre d'un litre.
2. Ajouter 200 ml d'eau bidistillée.
3. Ajouter soigneusement 800 ml de HCl concentré ; la dilution doit se faire dans une hotte bien aérée pour éviter toute exposition aux émanations toxiques libérées pendant la dissolution du KBrO<sub>3</sub>.
4. Envelopper la bouteille dans du papier aluminium.

Ces deux solutions peuvent être conservées à l'infini à condition d'être stockées dans un lieu exempt de mercure, à l'abri de la lumière et à température ambiante, dans une bouteille en Téflon ou en verre hermétiquement fermée.

### 2.2.7. Solutions étalons de mercure

*Solution étalon mère n 1 : 1 mg/ml de mercure dans de l'acide nitrique à 10 %*

1. Mettre exactement 1,354 g de HgCl<sub>2</sub> dans une fiole jaugée d'un litre.
2. Ajouter environ 500 ml d'eau bidistillée.
3. Ajouter 10 ml de HNO<sub>3</sub> concentré (faible en mercure).
4. Remplir jusqu'à la graduation avec de l'eau bidistillée.
5. Bien agiter jusqu'à dissolution complète.
6. Transvaser dans une bouteille en Téflon d'un litre.
7. Fermer hermétiquement avec une clé dynamométrique et conserver au réfrigérateur (+ 4°C).

*Solution étalon mère n 2 : 1 µg/ml de mercure dans du HNO<sub>3</sub> à 4 %*

1. Mettre 95 g d'eau bidistillée dans une bouteille en Téflon de 125 ml.
2. Ajouter 4 ml de HNO<sub>3</sub> concentré (faible en mercure).
3. Ajouter 1 ml de solution de BrCl (ou 2 ml de solution de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>).
4. Ajouter 100 µl de la solution mère n 1 (1 mg/ml de mercure).
5. Agiter vigoureusement.
6. Fermer hermétiquement avec une clé et conserver au réfrigérateur (+ 4°C).

*Courbe d'étalonnage (au moins trois étalons et étalonnage du zéro)*

1. Mettre environ 10 ml d'eau bidistillée dans une fiole jaugée propre de 50 ml.
2. Ajouter les réactifs comme dans les échantillons digérés ( $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$  2:1, ou  $\text{HNO}_3$ ).
3. Ajouter la quantité nécessaire de solution étalon mère (n 1 ou n 2, selon les concentrations des échantillons) avec une micropipette.
4. Ajouter 1 ml de solution de BrCl (ou 2 ml de solution de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ).
5. Diluer jusqu'à la graduation (50 ml) avec de l'eau distillée.
6. Agiter vigoureusement.

Il convient de préparer une nouvelle solution pour chaque jour d'analyse.

## 2.3. Analyse par spectrométrie d'absorption atomique de vapeur froide

### 2.3.1. Courbe d'étalonnage

Préparer des solutions étalons avec au moins trois concentrations étalons et un étalonnage du zéro. Préparer l'étalonnage du zéro comme les solutions étalons, mais sans ajouter l'étalon de mercure.

Si les échantillons ne se trouvent pas dans la courbe d'étalonnage, il convient de les diluer dans la même matrice ou de préparer une nouvelle courbe d'étalonnage.

### 2.3.2. Exigences relatives aux instruments

- Longueur d'onde : 253,7 nm
- Courant de la lampe : 4 mA
- Largeur de la fente : 0,5 nm
- Agent réducteur ( $\text{SnCl}_2$  20 % dans HCl 20 %) : 1 ml/min
- Eau bidistillée : 1 ml/min
- Solution de rinçage ( $\text{HNO}_3$  10 %) ou échantillon : 6,5 ml/min
- Gaz inerte : argon.

### 2.3.3. Optimisation du SAA

Les instructions suivantes s'appliquent au spectrophotomètre d'absorption atomique SpectrAA-10 Varian et au générateur de vapeur VGA-76, ou à tout système équivalent fondé sur le principe d'injection en flux continu. Si un autre instrument est utilisé, il convient de suivre les instructions du fabricant.

1. Veiller à ce que le disque à flammes soit inséré dans l'instrument.
2. Allumer l'imprimante, puis le spectrophotomètre.
3. Appuyer sur INDEX.
4. Sélectionner RÉPERTOIRE DE PROGRAMME.
5. Sélectionner le numéro du programme pour le mercure et appuyer sur RETENIR LE PROGRAMME.
6. Le paramètre MÉTHODE doit être réglé comme suit :
  - nombre d'éléments : 24
  - mode de l'instrument : ABS
  - étalonnage : doit être réglé sur CONCENTRATION
  - mesure : doit être réglé sur INTÉGRATION.

7. Les PARAMÈTRES DE L'INSTRUMENT doivent être réglés comme suit :
  - position de la lampe : la position codée est automatiquement reconnue
  - courant de la lampe : 4 mA
  - Introduction de l'échantillon : MANUELLE
  - délai (secondes) : 70
  - temps de mesure (secondes) : 5,0
  - réplicats : 3
  - correction du mouvement propre ON
8. Placer la lampe à vapeur de mercure dans la bonne position.
9. Aller dans NOTE. Sur cette page, la concentration qui donne une réponse de 0,2 ABS est indiquée.
10. Sélectionner la bonne largeur de fente (0,5) et définir le monochromateur sur la bonne longueur d'onde (253,7 nm).
11. Aller dans OPTIMISATION. Au cours de cette étape, la cellule d'absorption ne se trouve pas dans la trajectoire lumineuse du spectrophotomètre. Deux barres apparaissent à l'écran : l'une indique le niveau d'énergie de la lampe à vapeur de mercure, et l'autre, celui de la lampe au deutérium. Veiller à ce que le brûleur ne fasse pas obstacle à la lumière. Régler l'énergie de la lampe au maximum en optimisant successivement la longueur d'onde et la position de la lampe ; réaliser ces ajustements deux fois. Si la barre de signal est trop grande, appuyer sur RÉÉCHELONNER. Après l'optimisation, les niveaux d'énergie des deux lampes doivent être similaires. Si le message LAMPE AU DEUTÉRIUM TROP FAIBLE (ou TROP ÉLEVÉE) apparaît, (dés)activer l'atténuation de la lampe au deutérium.
12. Vérifier la valeur du photomultiplicateur (PMV environ 294 mV) et inscrire la valeur dans le registre.
13. Installer la cellule d'absorption sur la tête du brûleur et veiller à ce que le faisceau de lumière traverse la cellule près du centre.
14. Aller dans ÉTALONS et saisir les concentrations étalons pour la courbe d'étalonnage.

#### 2.3.4. Fonctionnement du générateur de vapeur (VGA)

1. Activer l'argon. Le débit de gaz doit être réglé au minimum et le voyant orange du VGA doit être éteint.
2. Mettre chacun des trois tubes capillaires en Téflon dans les solutions correspondantes :
  - iii. solution de  $\text{SnCl}_2$
  - iv. eau bidistillée
  - v. solution de rinçage ( $\text{HNO}_3$  à 10 %).
3. Activer le générateur de vapeur et serrer doucement la vis de réglage sur la pompe péristaltique jusqu'à ce que les liquides soient pompés (ne pas serrer la vis trop fort car cela raccourcirait la durée de vie des tubes de la pompe).
4. Veiller à ce qu'il n'y ait pas de fuites.
5. Laisser fonctionner le système pendant environ 10 minutes pour le nettoyer. Déconnecter le tube noir de la cellule d'absorption en quartz si le système n'a pas fonctionné depuis un moment (pour empêcher toute contamination).
6. Connecter le tube entre le séparateur gaz-liquide et la cellule d'absorption.



### 2.3.5. Étalonnage et évaluation des échantillons

La solution qui est sur le point d'être évaluée est indiquée dans la partie supérieure de l'écran du spectrophotomètre (blanc, étalon 1, 2, etc. ; réétalonnage ; échantillon 1, 2, etc.). Appuyer sur TYPE DE SOLUTION pour choisir la solution à analyser. Il convient de toujours s'assurer que la solution qui est sur le point d'être évaluée est bien celle qui a été demandée.

Appuyer sur LIRE pour évaluer une solution.

À ce stade, le spectrophotomètre et le générateur de vapeur doivent fonctionner.

1. Aller dans RÉSULTATS ANALYTIQUES.
2. Appuyer sur ZÉRO DE L'INSTRUMENT avec la solution de rinçage (HNO<sub>3</sub> à 10 %).
3. Évaluer la solution de rinçage en tant qu'échantillon : le résultat doit être 0,000 ABS.
4. Évaluer le blanc ou la courbe d'étalonnage en tant qu'échantillon. Le résultat doit aussi être proche de 0,000 ABS. Si ce n'est pas le cas, appuyer à nouveau sur ZÉRO DE L'INSTRUMENT lors de l'aspiration de la solution de rinçage.
5. Vérifier la valeur ABS pour un étalon de mercure (évaluer en tant qu'échantillon). Ceci permet de connaître la sensibilité de l'instrument et doit être noté dans le registre.
6. Aller dans ÉTALONNAGE.
7. Évaluer le blanc d'étalonnage puis les étalons.
8. Aspirer la solution de rinçage pendant environ une minute après chaque étalon.
9. Veiller à ce que la courbe d'étalonnage soit correcte.
10. Évaluer d'abord les blancs de réactifs, puis les matériaux de référence. Calculer la concentration en µg/g du matériau de référence et vérifier la précision du résultat avant de continuer.
11. Évaluer les échantillons.
12. Évaluer la solution de rinçage pendant environ une minute après chaque échantillon.
13. Évaluer un échantillon témoin et réétalonner tous les quatre ou cinq échantillons en fonction de la stabilité de l'instrument.
14. Évaluer le même échantillon de matériau de référence à intervalles réguliers pendant l'analyse.

### 2.3.6. Procédure d'arrêt

1. Rincer tous les tubes à l'eau bidistillée pendant environ 20 minutes (veiller à séparer le tube destiné à la solution de SnCl<sub>2</sub> des autres tubes).
2. Désactiver le système du VGA.
3. Libérer la tension des tubes.
4. Désactiver l'argon.
5. Éteindre l'imprimante et le spectrophotomètre.

### 2.3.7. Calcul

$$[C] (mg/kg) = \frac{(Cd - Cb) \times V}{W}$$

[C] – concentration en mercure de l'échantillon sec (µg/g sec)

Cd – concentration en mercure de la solution d'échantillon (µg/ml)

Cb – concentration moyenne en mercure des blancs de réactifs (µg/ml)

V – volume de dilution des échantillons digérés (ml) = 57,5 ml

W – poids sec de l'échantillon (g).

# 3. Dosage du mercure par double amalgamation avec l'or et détection par spectrométrie à fluorescence atomique de vapeur froide

## 3.1. Principe de la méthode

Après la décomposition des échantillons en présence d'acides forts, le  $\text{Hg}^{2+}$  est réduit à du mercure élémentaire  $\text{Hg}^0$  avec un excès de  $\text{SnCl}_2$ . Le mercure élémentaire est concentré dans un piège à or et détecté après absorption à  $600^\circ\text{C}$  par fluorescence atomique de vapeur froide à  $253,7\text{ nm}$ .

## 3.2. Équipement, matériel et solutions

### 3.2.1. Équipement

- Détecteur par spectroscopie de fluorescence atomique (AFS) (Brook Rand) ou autre équipement équivalent

### 3.2.2. Matériel

- Fioles jaugées, 100 ml, 500 ml et 1000 ml (classe A).
- Bouteilles en verre d'un litre nettoyées selon la procédure de nettoyage du verre.
- Barboteurs en Téflon (60 ml) (500 ml pour les échantillons d'eau) nettoyés selon la procédure de nettoyage du Téflon.
- Tubes en Téflon nettoyés selon la procédure de nettoyage du Téflon.
- Bouteilles en Téflon de 125 ml et 1 litre, nettoyées selon la procédure de nettoyage du Téflon.
- Laine de quartz nettoyée à  $500^\circ\text{C}$ .
- Sable aurifère.
- Colonnes en quartz pour pièges à or, nettoyées selon la procédure de nettoyage du verre.
- Colonnes de séchage (tube en Téflon ou tube en quartz rempli de chaux sodée) nettoyées selon la procédure de nettoyage du verre ou du Téflon.
- Système de chauffage pour pièges à or (2 VARIAC, 6A et minuteur ; fil en Cr/Ni 0,5 mm).
- Débitmètres.
- Intégrateur.
- Balance de précision.

### 3.2.3. Nettoyage du verre

Avant toute utilisation, il convient de nettoyer soigneusement tous les articles de laboratoire en verre comme suit.

- Faire tremper les flacons en Téflon et en verre une nuit dans une solution de nettoyant Micro-90 à 2 %.
- Rincer abondamment les flacons une première fois à l'eau du robinet, et une seconde fois à l'eau bidistillée.
- Rincer à l'aide d'une solution de  $\text{KMnO}_4$  à 0,5 %.

- Rincer ensuite à l'eau jusqu'à ce que la couleur de la solution de  $\text{KMnO}_4$  ne soit plus visible.
- Remplir les flacons d'une solution de  $\text{HCl}$  1 % et les stocker dans un emplacement exempt de mercure.
- Vider les fioles juste avant de les utiliser pour traiter les échantillons, et les faire sécher à  $60^\circ\text{C}$  dans une hotte à flux continu.

#### Nettoyage du Téflon

- Faire tremper les flacons une nuit dans un contenant en plastique avec une solution savonneuse (solution Micro à 2 % dans de l'eau du robinet).
- Rincer abondamment une première fois à l'eau du robinet, et une seconde fois à l'eau bidistillée.
- Mettre les flacons dans une solution concentrée de  $\text{HNO}_3$  à 50 % (vol/vol) et faire chauffer à  $60^\circ\text{C}$  pendant deux jours.
- Rincer abondamment à l'eau bidistillée (au moins quatre fois).
- Mettre les flacons dans une solution de  $\text{HCl}$  concentré à 10 % (vol/vol) pendant une journée (au moins) à température ambiante.
- Rincer abondamment à l'eau bidistillée (au moins quatre fois).
- Stocker tous les flacons dans des sachets en polyéthylène. Si possible (en particulier pour les bouteilles en Téflon et en verre), remplir les flacons de  $\text{HCl}$  à 1 %.

#### Réactifs et produits chimiques

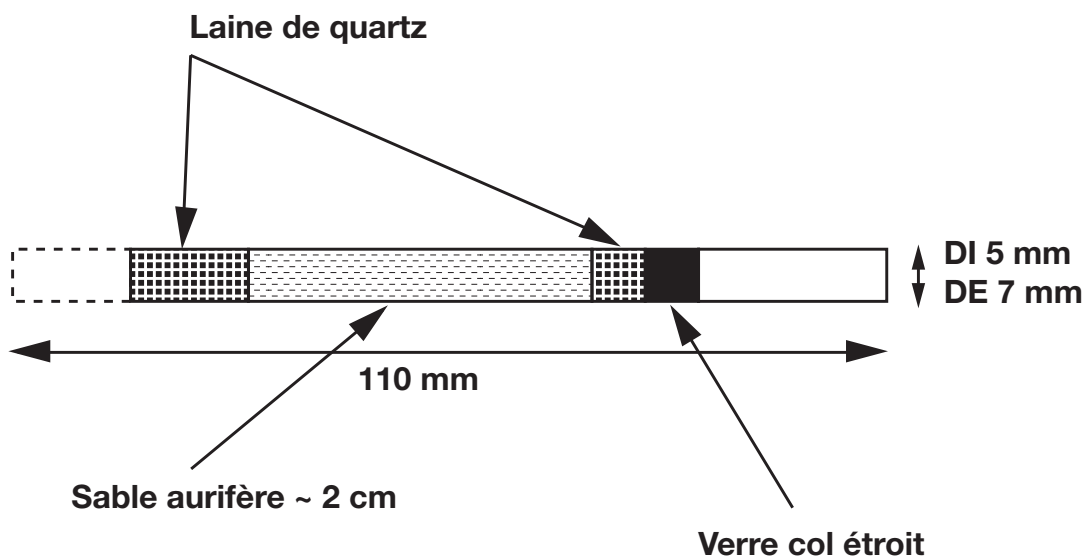
- $\text{SnCl}_2$  (qualité analytique)
- $\text{KBrO}_3$
- $\text{KBr}$
- $\text{HgCl}_2$  (qualité analytique, normal ou faible en mercure)
- $\text{HCl}$  (30 %)
- $\text{HNO}_3$  (65 %)
- $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (qualité analytique, faible en mercure)
- Pastilles de chaux sodée (qualité analytique)
- Eau déionisée bidistillée ( $> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ )
- Argon (purifié de mercure)

#### 3.2.4. Préparation du piège à or (figure 1)

1. Mettre un petit morceau de laine de quartz à l'extrémité de la partie la plus longue de la colonne. Fixer avec une pipette Pasteur.
2. Insérer environ 2 cm de sable aurifère. Il est recommandé de peser le sable qui sera inséré dans le piège pour obtenir une meilleure reproductibilité entre les pièges.
3. Insérer un plus gros morceau de laine de quartz au moyen d'une pipette Pasteur. Essayer de fixer tous les pièges de la même manière.
4. Nettoyer le nouveau piège au moins quatre fois avant de l'utiliser (voir procédure analytique).

Remarque : lors de l'utilisation de nouveaux pièges avant l'analyse des échantillons, vérifier la reproductibilité de la réponse standard pour tous les pièges.

Figure 1. Piège à or



### 3.2.5. Solutions de réactifs

*SnCl<sub>2</sub> à 20 % p/v dans HCl à 20 % vol/vol (100 ml)*

1. Mettre précisément 20 g de SnCl<sub>2</sub> dans un bécher en verre propre avec une spatule en plastique (le bécher et la spatule ne sont utilisés que pour le SnCl<sub>2</sub>).
2. Ajouter 20 ml de HCl concentré directement dans le SnCl<sub>2</sub> et transvaser dans une fiole jaugée de 100 ml. Mélanger et attendre que le SnCl<sub>2</sub> soit complètement dissous.
3. Ajouter de l'eau bidistillée jusqu'à la graduation (100 ml).
4. Avec une solution mère plus ancienne de SnCl<sub>2</sub>, il peut être nécessaire de réchauffer la solution sur une plaque chauffante pour parvenir à la dissolution complète du SnCl<sub>2</sub> (ne pas porter à ébullition).
5. Purger la solution de SnCl<sub>2</sub> avec de l'azote pendant deux heures pour obtenir une solution exempte de mercure.

Il existe deux options de solutions oxydantes.

*K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> à 10 % (p/v) dans de l'eau bidistillée*

1. Mettre 50 g de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> dans une fiole jaugée en verre propre de 500 ml.
2. Ajouter environ 250 ml d'eau bidistillée et agiter jusqu'à la dissolution du K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.
3. Remplir d'eau bidistillée jusqu'à la graduation.

*Solution oxydante BrCl*

1. Mettre précisément 11 g de KBrO<sub>3</sub> et 15 g de KBr dans une bouteille en verre propre d'un litre.
2. Ajouter 200 ml d'eau bidistillée.
3. Ajouter soigneusement 800 ml de HCl concentré ; la dilution doit se faire dans une hotte bien aérée pour éviter toute exposition aux émanations toxiques libérées pendant la dissolution du KBrO<sub>3</sub>.
4. Envelopper la bouteille dans du papier aluminium.

Ces deux solutions peuvent être conservées à l'infini à condition d'être stockées dans un lieu exempt de mercure, à l'abri de la lumière et à température ambiante, dans une bouteille en Téflon ou en verre hermétiquement fermée.

### 3.2.6. Solutions étalons de mercure

*Solution étalon mère : 1 mg/ml de mercure dans du HNO<sub>3</sub> à 10 %*

1. Mettre exactement 1,354 g de HgCl<sub>2</sub> dans une fiole jaugée d'un litre.
2. Ajouter environ 500 ml d'eau bidistillée.
3. Ajouter 10 ml de HNO<sub>3</sub> concentré (faible en mercure).
4. Remplir jusqu'à la graduation avec de l'eau bidistillée.
5. Bien agiter jusqu'à dissolution complète.
6. Transvaser dans une bouteille en Téflon d'un litre.
7. Fermer hermétiquement avec une clé dynamométrique et conserver au réfrigérateur (+ 4°C).

*Solution étalon intermédiaire : 1 µg/ml de mercure dans du HNO<sub>3</sub> à 4 %*

1. Mettre 95 g d'eau bidistillée dans une bouteille en Téflon de 125 ml.
2. Ajouter 4 ml de HNO<sub>3</sub> concentré (faible en mercure).
3. Ajouter 1 ml de solution de BrCl (ou 2 ml de solution de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>).
4. Ajouter 100 µl de la solution mère (1 mg/ml de Hg).
5. Agiter vigoureusement.

Si la solution doit être plus diluée, diluer la solution étalon intermédiaire en suivant la marche à suivre ci-dessus. Les bouteilles de solutions étalons doivent être fermées hermétiquement à l'aide d'une clé et conservées au réfrigérateur (+4°C).

### 3.3. Procédure analytique

1. Préparer les échantillons en suivant les étapes décrites ci-dessus.
2. Il convient de nettoyer les pièges à or avant toute utilisation en les chauffant à 600°C lorsqu'ils ne sont pas connectés au détecteur AFS. S'assurer ensuite qu'ils sont exempts de tout résidu de mercure en évaluant le mercure libéré après les avoir à nouveau chauffés.
3. Nettoyer le barboteur (une ou plusieurs fois si le système n'a pas été utilisé depuis un certain temps) selon la procédure ci-après.
4. Évaluer le blanc de barboteur selon la procédure qui suit et s'assurer que le système n'a pas été contaminé. Si les valeurs du blanc de barboteur sont trop élevées, continuer de nettoyer le système jusqu'à ce que les valeurs soient correctes et stables.
5. Étalonner le système en suivant les étapes de la procédure « courbe d'étalonnage » ci-dessous. Cet étalonnage doit être réalisé au moins deux fois par jour.
6. Évaluer le blanc de réactifs et les solutions de matériaux de référence (digérés en même temps que les échantillons) selon la procédure ci-dessous (« analyse du blanc de réactifs » et « analyse de l'échantillon »). S'assurer de l'absence de contamination au mercure et de la précision des mesures avant de procéder à l'analyse de l'échantillon.
7. Commencer à évaluer l'échantillon au moyen de la procédure décrite ci-après (analyse de l'échantillon). Lors de l'évaluation aux fins du contrôle de la qualité, le matériau de référence et les blancs de réactifs doivent être mesurés au moins deux fois pour chaque courbe d'étalonnage.

### 3.3.1. Nettoyage du barboteur

1. Rincer le barboteur et le remplir aux trois quarts d'eau bidistillée.
2. Ajouter 500 µl de solution de SnCl<sub>2</sub>.
3. Purger avec de l'argon pendant 15 minutes.

### 3.3.2. Blanc de barboteur

1. Rincer le barboteur et le remplir aux trois quarts d'eau bidistillée.
2. Ajouter 500 µl de solution de SnCl<sub>2</sub>.
3. Fixer le piège à or et purger avec de l'argon pendant 15 minutes.
4. Analyser le piège.

### 3.3.3. Courbe d'étalonnage

1. Rincer le barboteur et le remplir aux trois quarts d'eau bidistillée.
2. Ajouter une solution étalon (50 µl-150 µl de solution mère à 1 ng/ml, équivalent à 50 pg-150 pg de mercure).
3. Ajouter 500 µl de solution de SnCl<sub>2</sub>.
4. Fixer le piège à or et purger avec de l'argon pendant 15 minutes.
5. Retirer le piège et l'analyser.

La courbe d'étalonnage doit être préparée au niveau des concentrations des échantillons. Si nécessaire, il est possible d'utiliser plus d'étalons concentrés qu'indiqué.

### 3.3.4. Analyse du blanc de réactifs

1. Rincer et remplir le barboteur d'eau bidistillée (la quantité d'eau bidistillée dépend du volume de blanc de réactifs à ajouter).
2. Ajouter la solution à blanc (blanc de réactifs). Le volume doit être au moins égal au volume de l'échantillon qui sera utilisé pour les analyses (c'est-à-dire que s'il faut 10 ml d'échantillon pour l'analyse, il faut analyser au moins 10 ml de blanc de réactifs). Si le niveau de mercure dans le blanc de réactifs est très faible, il est possible d'utiliser de plus grands volumes de solution à blanc pour l'analyse.
3. Ajouter 500 µl de la solution de SnCl<sub>2</sub>.
4. Fixer le piège à or et purger avec de l'argon pendant 15 minutes (cf. Figure 2)
5. Retirer le piège à or et l'analyser (cf. Figure 3).

### 3.3.5. Analyse de l'échantillon

1. Rincer et remplir le barboteur d'eau bidistillée (la quantité d'eau bidistillée dépend du volume d'échantillon à ajouter, de 0 ml pour les échantillons à faible concentration, tels que l'urine et le sang, à trois quarts du volume du barboteur pour les échantillons à plus haute concentration).
2. Ajouter la solution d'échantillon. Le volume d'échantillon à ajouter dépend de la concentration de l'échantillon et varie entre quelques microlitres pour les échantillons de cheveux et quelques millilitres pour les échantillons de sang et d'urine. La réponse obtenue des échantillons doit se trouver dans les limites de la courbe d'étalonnage.
3. Ajouter 500 µl de la solution de SnCl<sub>2</sub>.
4. Fixer le piège à or et purger avec de l'argon (azote ou air) pendant 15 minutes (cf. Figure 2).
5. Retirer le piège à or et l'analyser (cf. Figure 3).

Figure 2. Système de dosage du mercure avec barboteur

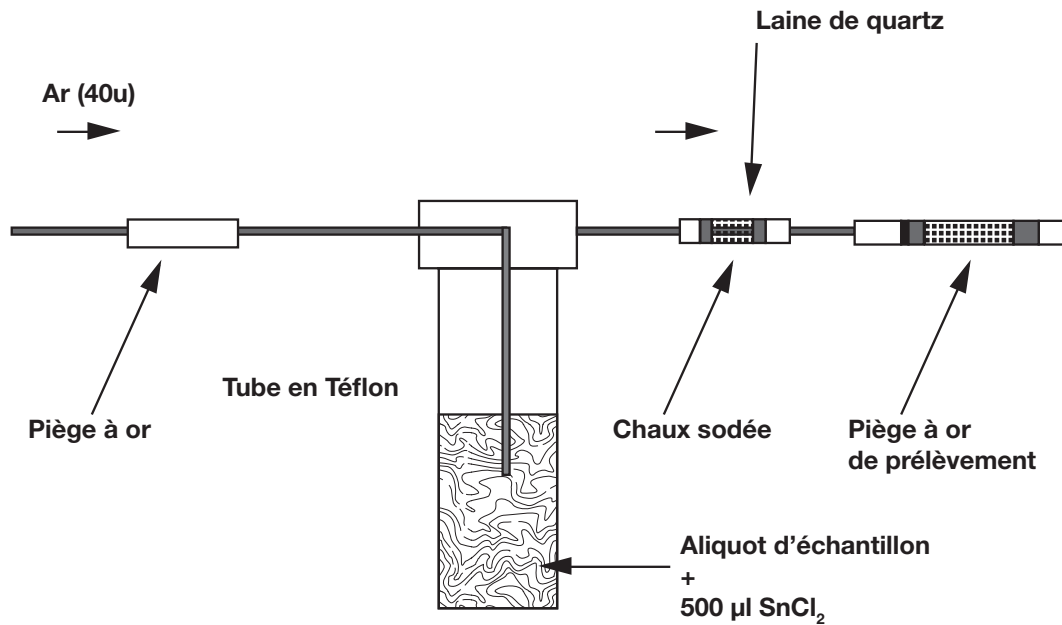
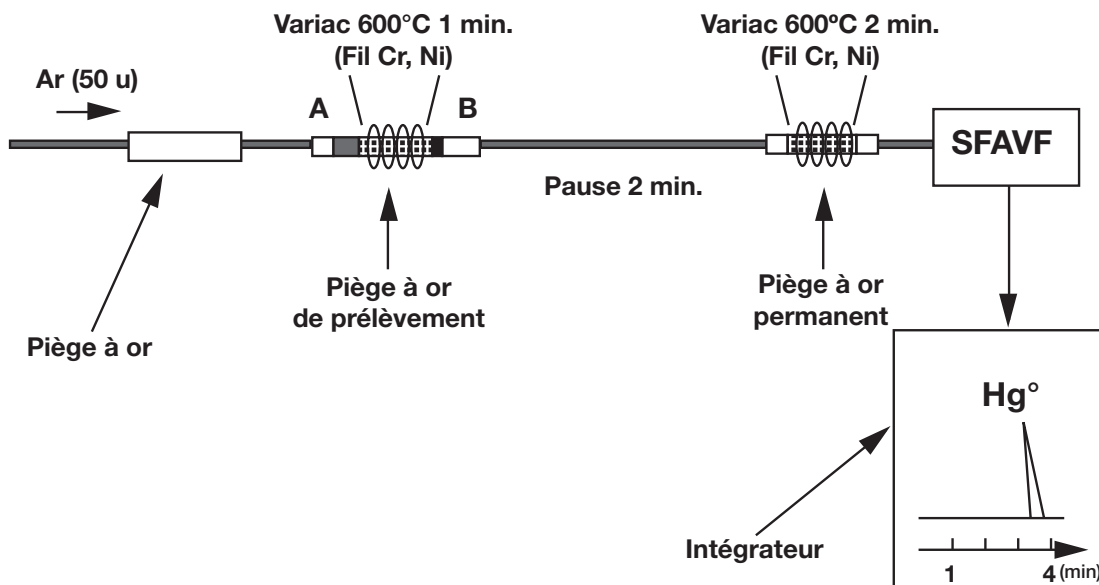


Figure 3. Système analytique



### 3.3.6. Analyse par double amalgamation (figure 3)

1. Mettre le piège à or de prélèvement sur le système de mesure (analytique) sous un flux d'argon.
2. Libérer le mercure en chauffant le piège à or de prélèvement pendant une minute à 600°C.
3. Attendre deux minutes que le mercure fusionne avec le piège à or permanent.
4. Libérer le mercure du piège à or permanent en le chauffant deux minutes à 600°C.
5. Détecter par spectrométrie à fluorescence atomique de vapeur froide (SFAVF).

### 3.4. Calcul

Préparer la courbe d'étalonnage avec :

- pg de  $\text{Hg}^{2+}$  dans l'étalon ajouté
- réponse de l'intégrateur (aire du pic en unités arbitraires).

Calculer la courbe d'étalonnage sur la base de la régression linéaire de tous les points étalons (au moins trois) et de la moyenne des blancs de barboteur (unité) pour la valeur zéro :

$$y = b + ax$$

Blanc de réactifs :

$$[B](pg/ml) = \frac{(Ab - b)}{a \times V}$$

[B] – concentration en méthylmercure dans le blanc de réactifs (pg/ml)

Ab – réponse obtenue pour l'aliquot du blanc de réactifs analysé (zone de pic en unités arbitraires)

V – volume de blanc de réactifs analysé (ml)

Échantillons :

$$[S](pg/g) = \frac{\left[ \left[ \frac{As - b}{a \times Va} \right] - [B] \right] \times Vs}{W}$$

[S] – concentration en mercure de l'échantillon sec (pg/g sec)

As – réponse obtenue de l'aliquot d'échantillon analysé (zone de pic en unités arbitraires)

Va – aliquot d'échantillon analysé (ml)

Vs – volume d'échantillon total (ml)

W – poids sec de l'échantillon (g)

[B] – concentration en méthylmercure dans le blanc de réactifs (pg/ml)

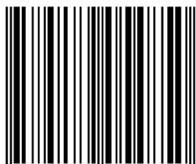


## Le Bureau régional de l'OMS pour l'Europe

L'Organisation mondiale de la Santé (OMS) est une institution spécialisée des Nations Unies. Créée en 1948, elle est essentiellement en charge de questions de santé internationales et de santé publique. Le Bureau régional de l'OMS pour l'Europe est un des six bureaux régionaux présents dans le monde qui disposent chacun de leur propre programme axé sur les conditions sanitaires particulières des pays concernés.

### États membres

Albanie  
Allemagne  
Andorre  
Arménie  
Autriche  
Azerbaïdjan  
Biélarus  
Belgique  
Bosnie-Herzégovine  
Bulgarie  
Chypre  
Croatie  
Danemark  
Espagne  
Estonie  
Fédération de Russie  
Finlande  
France  
Géorgie  
Grèce  
Hongrie  
Irlande  
Islande  
Israël  
Italie  
Kazakhstan  
Kirghizistan  
Lettonie  
Lituanie  
Luxembourg  
Macédoine du Nord  
Malte  
Monaco  
Monténégro  
Norvège  
Ouzbékistan  
Pays-Bas  
Pologne  
Portugal  
République de Moldova  
Roumanie  
Royaume-Uni  
Saint-Marin  
Serbie  
Slovaquie  
Slovénie  
Suède  
Suisse  
Tadjikistan  
Tchéquie  
Turkménistan  
Turquie  
Ukraine



9 789289 054850 >

**Bureau régional de  
l'Organisation mondiale de la Santé pour l'Europe**  
UN City, Marmorvej 51, DK-2100 Copenhagen Ø, Denmark  
Tel.: +45 45 33 70 00 Fax: +45 45 33 70 01  
E-mail: [contact@euro.who.int](mailto:contact@euro.who.int)