



Détermination des teneurs en sous-produits de chloration dans les organismes marins du Golfe de Fos

- FOS-SEA -

2019



Justine Mas

julien.dron@institut-ecocitoyen.fr 04 90 55 49 97 / 07 61 87 00 25

Institut Ecocitoyen pour la Connaissance des Pollutions
RD268 - Centre de vie la Fossette - 13270 Fos-sur-Mer 04.90.55.49.94 – www.institut-ecocitoyen.fr

Le présent rapport est publié sous licence CC-BY-ND



Les données, les interprétations et les images présentes dans ce rapport sont la propriété de l'Institut Écociroyen pour la Connaissance des Pollutions, libres d'accès et d'utilisation à condition de citer les références du rapport et d'indiquer la source des données, photos, et graphiques ("Institut Écociroyen pour la Connaissance des Pollutions - Fos sur Mer").

Il ne sera pas apporté de modifications à la version originale du rapport à des fins de diffusion. L'Institut Écociroyen pour la Connaissance des Pollutions ne pourra être tenu responsable de toute interprétation réalisée par un tiers et qui n'est pas explicitement détaillée dans ce rapport.

Pour citer ce rapport :

Justine Mas. Détermination des teneurs en sous-produits de chloration dans les organismes marins du Golfe de Fos. Institut Écociroyen pour la Connaissance des Pollutions, 2019.

RAPPORT DE STAGE DU MASTER PROFESSIONNEL

**DÉTERMINATION DES TENEURS EN SOUS-PRODUITS
DE CHLORATION DANS LES ORGANISMES MARINS
DU GOLFE DE FOS**



Justine MAS

Master Sciences de l'Environnement Terrestre,

Science de l'eau, spécialité Gestion des Eaux et des Milieux Aquatiques

Aix-Marseille Université

2018-2019

Mr Julien Dron – Institut Ecocitoyen pour la Connaissance des Pollutions, Fos-sur-Mer - Tuteur

Mr Jean-Luc Boudenne – LCE, Aix-Marseille Université – Enseignant Référent

Résumé

La chloration de l'eau est la technique la plus utilisée dans l'industrie pour éviter la contamination microbienne et le biofouling. L'ajout de chlore dans les eaux conduit à la formation de sous-produits de chloration (SPC) qui peuvent avoir des effets néfastes sur les organismes marins. Le 2,4,6-tribromophénol (2,4,6-TBP) est le SPC le plus répandu au niveau de la bioaccumulation dans les espèces marines. Dans cette étude, nous avons développé une méthode d'analyse par GC-ECD du 2,4,6-TBP chez le congre européen (*Conger Conger*) (muscles et foies), les oursins violets (*Paracentrotus lividus*) et les moules méditerranéennes (*Mytilus galloprovincialis*). Appliquées sur des échantillons du Golfe de Fos, les analyses ont montré des taux en 2,4,6-TBP plus élevés chez les oursins, allant de 62,11 à 205,31 µg/kg de poids sec, que dans les muscles des congres, allant de 8,98 à 66,46 µg/kg de poids sec. Ces valeurs retrouvées dans différents organismes marins traduisent une imprégnation générale du Golfe de Fos aux SPC, et un facteur de bioconcentration élevé pour le 2,4,6-TBP.

Mots-clés : Sous produit de chloration, 2, 4, 6-tribromophénol, GC-ECD, bioconcentration, congres (*Conger Conger*), oursins (*Paracentrotus lividus*).

Abstract

Water chlorination is the most widely used technique in the industry to avoid microbial contamination and biofouling. Adding chlorine to the water leads to the formation of chlorination by-products (CBPs) that can have adverse effects on marine organisms. Among them, 2,4,6-Tribromophenol (2,4,6-TBP) is the most prevalent CBPs in terms of bioaccumulation in marine species. In this study, we developed a method by GC-ECD to analyse 2,4,6-TBP in the European conger (*Conger Conger*) (muscles and livers), purple sea urchins (*Paracentrotus lividus*) and Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). Applied to field samples from the Gulf of Fos, the analyses showed higher levels of 2.4.6-TBP in sea urchins ranging from 62.11 to 205.31 µg/kg of dry weight than in conger muscles ranging from 8.98 to 66.46 µg/kg of dry weight. These values found in different marin organisms reflect an extensive impregnation of the Gulf of Fos to the SPCs and a high bioconcentratin factor for 2.4,6-TBP.

Keywords : Chloration by product, 2, 4, 6-Tribromophenol, GC-ECD, bioconcentration, conger (*Conger Conger*), sea urchins (*Paracentrotus lividus*).

Remerciements

Je tiens à remercier, mon tuteur de stage M. Julien Dron, responsable scientifique au sein de l'Institut Écocitoyen, de m'avoir permis de réaliser ce stage et d'avoir été disponible et bienveillant à mon égard durant ces 6 mois.

Je remercie également, le directeur de l'Institut, M. Philippe Chamaret, ainsi que l'ensemble de l'équipe Jocelyne Urban, Sandra Alastra, Annabelle Austruy, Véronique Granier, Gautier Revenko et Marine Periot, pour leur accueil et leur convivialité, pendant mes derniers mois de stage à l'Institut.

Je remercie le Laboratoire de Chimie de l'Environnement, de l'Université d'Aix-Marseille à Saint-Charles, de m'avoir accueillie durant le développement analytique, notamment M^{me} Carine Demelas et M^{me} Amandine Durand qui m'ont formées aux techniques d'analyse chimique.

Sans oublier M. Jean-Luc Boudenne, responsable de l'équipe TRAME : Transfert Réactivité Analyse Modélisation Environnement, pour ses conseils précieux pour le bon déroulement des analyses. Je le remercie aussi de m'avoir permis de participer au 8TH International Conference On Swimming Pool and Spa organisé par le LCD, à Marseille.

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	3
Remerciements.....	4
Introduction.....	8
Descriptions générales.....	10
1. L'Institut Écocitoyen pour la Connaissance des Pollutions.....	10
2. Présentation de la zone d'étude : le Golfe de Fos.....	11
a) Contexte géographique.....	11
b) Contexte hydrologique.....	12
c) Formation des sous-produits de chloration.....	13
3. Présentation des espèces.....	13
Matériel et mise au point de la méthode d'analyse du 2,4,6-tribromophénol dans le muscle du congre.....	15
Échantillonnages.....	15
Méthodes d'extraction.....	16
a) ASE : extraction accélérée par solvant.....	16
b) Ultrasons.....	17
3. Purification des échantillons : SPE.....	17
4. Analyse du 2,4,6 tribromophénol par chromatographie en phase gazeuse.....	20
5. Validation de la méthode analytique.....	23
La linéarité.....	23
b) La répétabilité.....	24
b) Limite de détection et de quantification.....	24
6. Protocole analytique.....	25
Résultats et Discussions.....	27
1. Muscles du congre.....	27
Influences des paramètres physiologiques sur les niveaux de contaminations.....	27
Influences de la zone géographique.....	29
2. Oursins.....	35
Influences des paramètres physiologiques sur les niveaux de contaminations.....	35
Influence de la zone géographique.....	36
Conclusion.....	39
Bibliographie.....	40
ANNEXES.....	42

Table des Figures

Figure 1 : Jeux d'acteurs au sein de l'Institut Écociroyen.....	10
Figure 2 : Localisation de la zone d'étude et activités industrielles du Golfe de Fos.....	11
Figure 3 : Localisation des individus pêchés dans le Golfe de Fos.....	15
Figure 4 : ASE.....	16
Figure 5 : Manifold d'extraction.....	18
Figure 6 : Étapes d'extractions en phase solide.....	18
Figure 7 : Purification en phase solide du 2,4,6 tribromophénol.....	19
Figure 8 : Droite d'étalonnage interne de la gamme ($\mu\text{g/L}$).....	22
Figure 9 : Exemple de chromatogramme avec un détecteur ECD d'un muscle de congre.....	22
Figure 10 : Courbe étalonnage de la gamme poissons.....	23
Figure 11 : Concentrations en 2,4,6-TBP en fonction de la matière grasse des congres.....	28
Figure 12 : Concentrations en 2,4,6-TBP après correction de l'effet de la matière grasse en fonction de la taille des congres.....	29
Figure 13 : Valeurs moyennes des rapports isotopiques $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ (‰) après correction de l'effet de taille. Les barres indiquent les intervalles de confiance à 95 %.	30
Figure 14 : Concentrations ($\mu\text{g/kg}$ de poids sec) dans les muscles de congre selon leur localisation dans le Golfe de Fos.....	31
Figure 15 : Concentrations en 2,4,6-TBP en fonction de la zone géographique, Concentration corrigée par la matière grasse en fonction de la zone géographique.	32
Figure 16 : Répartition géographique des concentrations en 2,4,6-TBP ($\mu\text{g/L}$) dans les eaux du Golfe de Fos	33
Figure 17 : Concentrations en 2,4,6-TBP après correction de l'effet de la matière grasse ($\mu\text{g/kg}$) en fonction du poids des oursins.....	35
Figure 18 : Concentrations ($\mu\text{g/kg}$ de poids sec) dans les oursins selon leur localisation dans le Golfe de Fos.....	36
Figure 19 : Concentrations en 2,4,6-TBP corrigées par la matière grasse en fonction des stations de prélèvements, concentrations corrigées par la matière grasse puis par le poids en fonction des stations de prélèvements.....	37

Index des tableaux

Tableau 1 : Détermination du volume d'élution en SPE.....	19
Tableau 2 : Rendements de la méthode d'extraction par SPE Florisil.....	20
Tableau 3 : Paramètres de la GC-ECD pour la quantification du 2,4,6-TBP.....	21
Tableau 4 : Gamme étalon en GC-ECD du 2,4,5 TCP et du 2,4,6-TBP.....	21
Tableau 5 : Gamme réalisée dans la matrice poissons (pêchés en 2014).....	23
Tableau 6 : Répétabilité de la méthode.....	24
Tableau 7 : Détermination des LD et LQ.....	25
Tableau 8 : Valeurs moyennes et écarts-types en µg/kg des concentrations dans les muscles de congre pour chaque zone d'étude.....	31
Tableau 9 : Valeurs moyennes et écarts-types en µg/kg des concentrations dans les oursins pour chaque zone d'étude.....	36

Introduction

Le Golfe de Fos, situé sur le littoral Méditerranéen à proximité de Marseille, est le plus grand port commercial français, comprenant une zone d'activité industrielle majeure, constituée d'industries lourdes : sidérurgies, pétrochimie, raffineries, incinérateurs de déchets, terminaux méthaniers, centrales thermiques... Localisé entre l'Étang de Berre et l'embouchure Rhône, il est soumis aux intrants de masses d'eaux douces potentiellement contaminées et aux activités anthropiques locales liées majoritairement aux rejets industriels.

La plupart de ces sites industriels utilisent d'importants volumes d'eau de mer afin de refroidir leurs installations (centrales thermiques, industries sidérurgiques et pétrochimiques) ou pour les réchauffer comme les terminaux méthaniers (Tonkin et Cavou) pour la liquéfaction des gaz. Ce procédé entraîne la formation de biofouling (algues, moules) dans les conduites hydrauliques pouvant les colmater, réduisant considérablement leur efficacité. Pour régler ce problème, la chloration de l'eau de mer est l'un des moyens les plus efficaces et les plus courants en matière de moyens et de coûts. La chloration est généralement mise en œuvre par dissolution du chlore gazeux, par addition d'hypochlorite de sodium (NaHClO), à des doses de à 0,5 à 1,5 mg/L ou par électrochloration de l'eau de mer.

Le projet FOS-SEA piloté par l'Institut Écocitoyen pour la Connaissance des Pollutions (IECP) et le Laboratoire de Chimie de l'Environnement (LCE), vise à évaluer le risque environnemental lié à la maîtrise du biofouling par chloration en zone littorale méditerranéenne. Jusqu'à présent aucune étude n'avait été effectuée à une si grande échelle qu'est le Golfe de Fos, où les rejets d'eaux chlorées sont multiples (7 rejets de débits supérieurs à 10 000 m³/h d'eau de mer prélevée et rejetée) et chroniques. Peu de recherches ont été menées sur la réactivité et le devenir des sous-produits de chloration (SPC), qui se forment lorsque le chlore libre réagit avec les divers composés présents dans les eaux littorales ainsi que leur impact sur le milieu marin. Ce vaste projet d'une durée de 4 ans initié en 2016 va permettre une meilleure connaissance de la nature des SPC, de déterminer les schémas réactionnels de leur formation et de leur devenir dans le milieu récepteur, d'étudier leur transfert dans les différents compartiments de l'environnement (eau, air, mollusques, poissons, sédiments) et leur dissémination et, enfin, d'étudier leur toxicité globale ainsi que celle de leurs produits de transformation.

L'objectif de ce stage est tout d'abord de développer une méthode analytique permettant de doser le 2,4,6-tribromophénol (TBP), dans les organismes marins prélevés dans le Golfe de Fos en novembre 2017, car il est un SPC présumé le mieux accumulé dans les organismes marins. Pour cela, une méthode d'extraction suivie d'une analyse par chromatographie gazeuse couplée à un détecteur d'électrons (GC-ECD) sera mise au point pour identifier et quantifier, le 2,4,6-tribromophénol dans différentes matrices

environnementales : muscles et foies de congres, oursins et moules. Dans un second temps, les résultats seront analysés de façon statistique. Ces mesures permettront d'améliorer les connaissances de bioaccumulations du TBP dans différents organismes en fonction des espèces, de leur localisation, de leur place dans la chaîne alimentaire, de leur morphologie... La finalité de cette étude est de savoir, à terme, s'il peut y avoir un risque pour le consommateur.

Descriptions générales

1. L'Institut Écocitoyen pour la Connaissance des Pollutions

L'histoire récente de la Zone Industriale-Portuaire de Fos retrace l'ensemble des problématiques de santé publique de qualité environnementale et des liens d'opposition entre les acteurs du territoire (citoyens, industriels, élus, services de l'État). Sur ce constat les élus d'Ouest Provence ont alors décidé de doter cet espace intercommunal d'une politique scientifique afin de mieux appréhender les décisions d'aménagement du territoire sur la base d'échanges sereins et acceptés par tous. Une des premières mesures a été la création de l'Institut Écocitoyen pour la Connaissance des Pollutions.

Implanté au cœur de la ZIP de Fos, l'Institut Écocitoyen participe à la mutation profonde des relations entre population, industriels, élus et services de l'État. En effet, les investigations menées pour l'identification des pollutions permettent de mieux appréhender leurs effets afin de porter à la connaissance des citoyens et des décideurs politiques l'impact sur l'environnement.

Pour la première fois en France, une structure d'échanges, d'actions et de concertation autour des risques environnementaux et sanitaires, associée à un conseil scientifique composé de chercheurs, d'universitaires, de médecins, d'experts et d'un groupe de citoyens volontaires participe de concert à l'information et l'observation environnementale.

L'institut est avant tout un centre de savoirs, de connaissances de l'environnement, des pollutions, de leurs impacts écologiques et sanitaires, à dimension métropolitaine aujourd'hui.

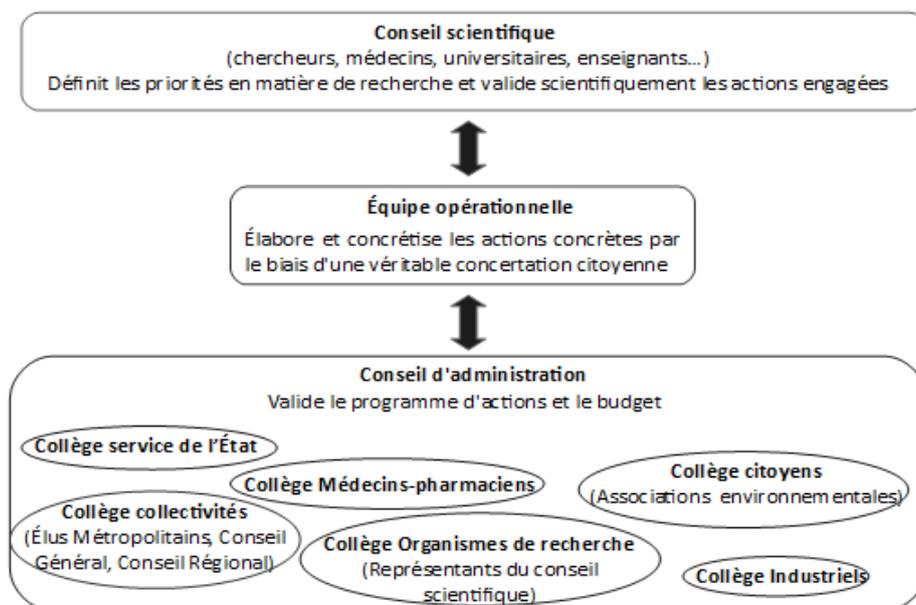


Figure 1 : Jeux d'acteurs au sein de l'Institut Écocitoyen

2. Présentation de la zone d'étude : le Golfe de Fos

a) Contexte géographique

Le Golfe de Fos s'étend sur environ 15 km d'est en ouest, bordant les communes de Martigues, Port-de-Bouc, Fos-sur-Mer et Port-Saint-Louis-du-Rhône. Sa superficie représente 100 km², dont une grande partie se situe au nord du They de la Gracieuse, étendue sableuse qui a la particularité de fermer en partie le golfe.

La géographie du golfe a profondément été marquée par les installations du Grand Port Maritime de Marseille-Fos (GPM) et le percement de plusieurs darses dont les plus importantes, les darses 1 et 2, mesurent 5 km de long et plus de 500 m de large. La Darse 4, constituée d'installations pétrolières et de terminaux méthaniers, augmente le confinement de la partie ouest.

Les eaux du golfe peuvent atteindre entre 50 à 60 m de profondeur sur sa partie sud et en moyenne 8 m de profondeur dans sa partie nord. Des drainages réguliers sont nécessaires, entre 10 et 20 m de profondeur, dans chacune des darses et le bassin de Gloria.

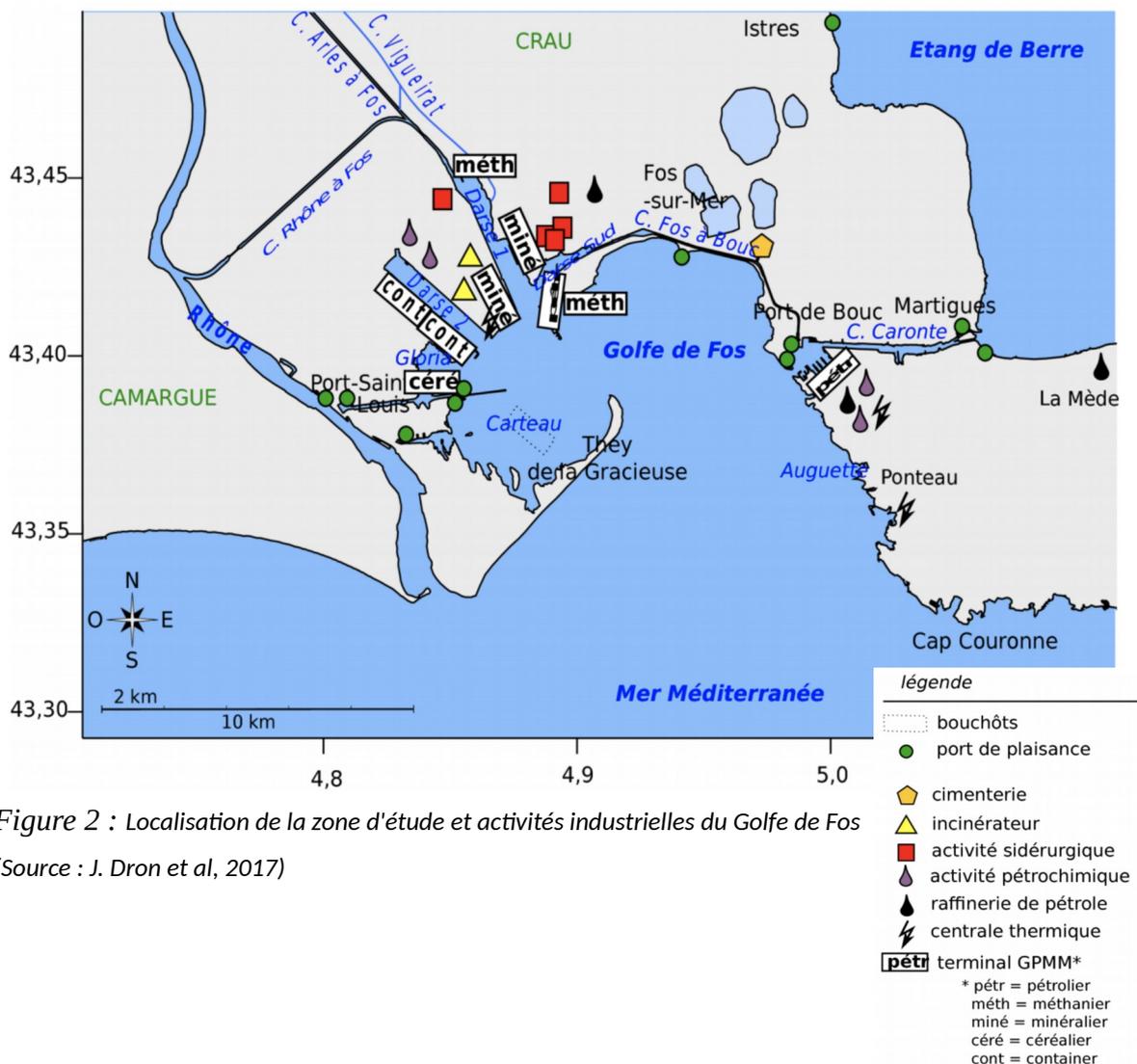


Figure 2 : Localisation de la zone d'étude et activités industrielles du Golfe de Fos

(Source : J. Dron et al, 2017)

b) Contexte hydrologique

Le Golfe de Fos, comme la plupart des bassins et baies maritimes, est soumis à un apport d'eaux douces continentales qui constituent une source de contamination chimique du milieu marin.

En effet, le Golfe de Fos est particulièrement impacté par les eaux du Rhône qui peuvent être une source potentielle de contamination. D'autres sources autour du golfe peuvent jouer un rôle important comme le canal de Caronte, exutoire de l'Étang de Berre et dans une moindre mesure les divers canaux, principalement en Darse 1 de la Zone Industriale-Portuaire.

Fleuve Rhône

Le Rhône joue un rôle essentiel dans l'ensemble du Golfe du Lion dont il contribue à hauteur de 90% des apports en eaux fluviales (Duchez et al. 2011). Son débit s'étant de 500 à 2500 m³/s avec des pointes de 4000 m³/s hors crues et constitue le second fleuve de Méditerranée après le Nil.

La proximité de l'embouchure du Rhône avec le Golfe de Fos, favorisée par les courants et les conditions météorologiques, essentiellement par vent de sud-ouest et sud-est, impacte le golfe vers l'intérieur jusqu'au fond de l'Anse de Carteau.

Ces intrusions ont un effet sur les contaminations chimiques des eaux (Ulses et al. 2005; Pinazo et al. 2013) ; en effet le fleuve traverse des zones urbanisées, agricoles et industrielles notamment au niveau de Lyon et plus au sud.

Canal de Caronte

Ce canal reliant l'Étang de Berre au Golfe de Fos, constitue la deuxième source en eau douce du Golfe, son débit est d'environ 100 à 200 m³/s.

L'Étang de Berre, quant à lui, reçoit les eaux du canal EDF provenant de la Durance ainsi que de deux rivières : la Touloubre et l'Arc. Les eaux de l'Étang sont soumises à l'impact des stations d'épuration et de deux sites industriels pétrochimiques importants Berre et La Mède situés sur les abords.

Les principaux canaux

Ces canaux se jettent en majorité dans le golfe par l'intermédiaire de la Darse 1 du Grand Port Maritime de Marseille. L'apport en eau douce est assuré par le canal du Rhône à Fos et d'Arles à Fos dont le débit est d'environ 8,5 m³/s et le canal de Fos à Port-de Bouc dont le débit est d'environ de 5,4 m³/s. Il faut noter également le canal du Viguerat et l'émergence de la Nappe de Crau dans le nord du Golfe au large du Cavaou.

Il reste difficile d'estimer les débits des différents canaux, mais il a toutefois été estimé que l'ensemble des apports en eau douce varient entre 12 et 92 m³/s (Ulses et al. 2005).

c) Formation des sous-produits de chloration

La chloration de l'eau de mer, pour lutter contre le biofouling et le développement bactérien, est utilisée pour la grande capacité oxydante du chlore et son action de désinfection le rendant très réactif avec les constituants de l'eau. Une fois ajoutée à l'eau de mer, les réactions chimiques mises en œuvre sont variées et complexes. En effet, l'eau de mer est caractérisée par la présence de nombreux ions dissous.

Le chlore sous forme d'oxydant libre réagit rapidement avec tous les composés organiques et inorganiques présents naturellement ou non dans le milieu récepteur. En présence d'ammoniac, le chlore libre réagit très rapidement en formant des mono-, di- ou trichloramines, et des sous-produits chlorés. Les ions bromure présents naturellement dans l'eau de mer sont oxydés en brome libre, donnant lieu à la formation des bromamines. Elles réagissent plus rapidement que le chlore, entraînant la formation de dérivés majoritairement organobromés (Abarnou, 1981).

Ainsi de nombreux sous-produits de chloration ont été identifiés dans l'eau de mer. Parmi eux nous retrouvons principalement, les trihalométhanes (THM) chlorés et bromés (bromoforme, chloroforme, dichlorobromométhane, dibromochlorométhane), les acides haloacétiques (HAA), les haloacétonitriles (HAN), les trihalogénoacétaldéhydes (THA) et les halophénols (HP). La présence de ces derniers, avérés ou soupçonnés toxiques, constitue une préoccupation environnementale et sanitaire majeure. En effet, même si les concentrations en SPC formées en mer restent faibles, leurs effets sur le long terme ne sont pas négligeables.

3. Présentation des espèces

Les espèces sélectionnées pour cette étude sont celles assez représentatives de l'écosystème du Golfe de Fos dans le but de caractériser l'imprégnation de l'ensemble du milieu marin aux contaminations chimiques, notamment des sous-produits de chloration.

Le choix c'est porté en premier lieu sur une espèce carnivore sédentaire, le congre (*Conger Conger*). Cette espèce, de part son caractère sédentaire et son haut niveau dans la chaîne trophique, garantit une contamination par biomagnification et reste potentiellement un indicateur géographique permettant d'identifier les principales sources de pollutions. Le congre est une espèce peu consommée autour du golfe, la pêche commerciale n'y étant pas pratiquée. C'est aussi pour cet aspect socio-économique qu'il a été sélectionné. (Gramaglia et Mélard, 2019). Peu d'études traitent de la bioaccumulation des contaminants chez cette espèce, mais l'Institut Écociroyen l'avait déjà employée il y a quelques années pour décrire la contamination chimique du milieu marin dans le Golfe de Fos (Dron et al., 2019). Pour cette étude, les muscles et les foies seront analysés. La bioaccumulation dans les muscles, étant intégrée pendant plusieurs

mois, est moins rapide que dans les foies, qui eux représentent une exposition ponctuelle aux polluants (derniers jours/semaines).

Pour caractériser une exposition typiquement benthique, un organisme fouisseur a été choisi, l'oursin violet (*Paracentrotus lividus*). Cette espèce est, de plus, étudiée en parallèle au niveau écotoxicologique dans le projet FOS-SEA, dont les premiers résultats indiquent une résistance accrue aux SPC des larves d'oursins en site exposé par rapport à celles issues d'un site non-exposé. (Lebaron et al. 2019)

Enfin, pour qualifier une exposition aux SPC plus caractéristique de la colonne d'eau, la moule méditerranéenne (*Mytilus galloprovincialis*) a été sélectionnée. La moule est un bioindicateur de la qualité de l'eau. Cet organisme filtreur concentre différentes substances présentes dans l'eau de mer (HAP, PCB, métaux...). Cette espèce est largement employée dans de nombreux suivis environnementaux. (Andral et al, 2004; Menet-Nedelec et al, 2018).

Matériel et mise au point de la méthode d'analyse du 2,4,6-tribromophénol dans le muscle du congre

1. Échantillonnages

Les organismes marins ont été pêchés entre fin octobre et fin novembre 2017 sur 11 stations de prélèvements regroupant les communes de Martigues, Port-de-Bouc, Fos-sur-Mer et Port-Saint-Louis-du-Rhône.

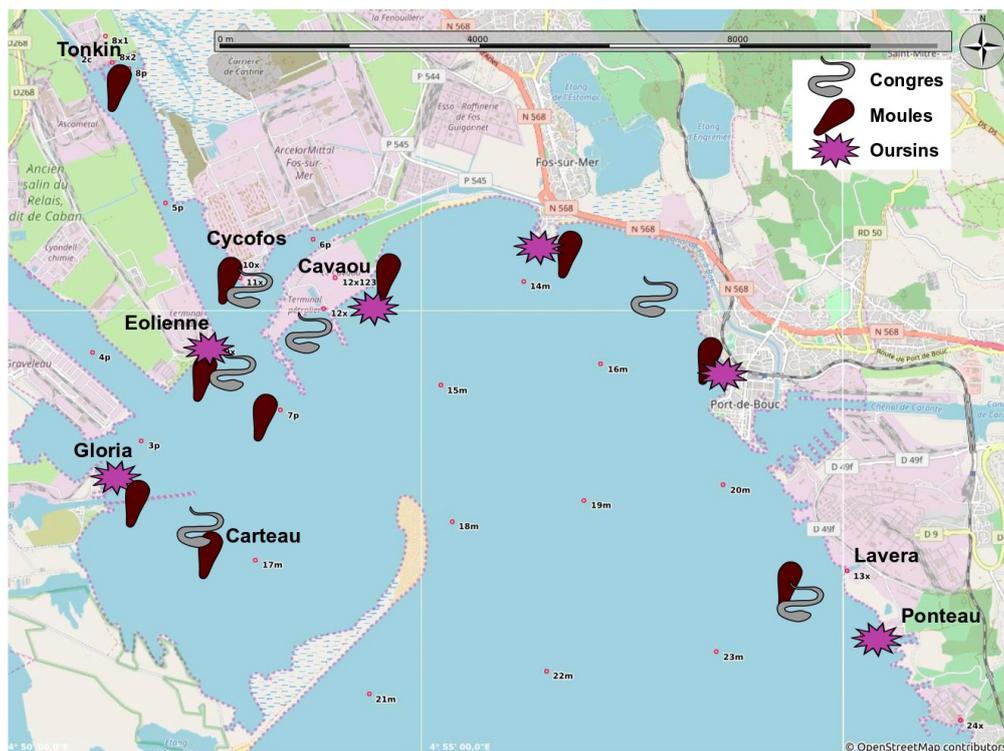


Figure 3 : Localisation des individus pêchés dans le Golfe de Fos

Au total, 23 congres femelles ont été pêchés, mesurant entre 66 et 140 cm pour un poids de 0,5 à 6 kg. Les ratios isotopiques de l'azote et du carbone, mesurés lors d'un stage précédent, ont montré que le congre se situe bien au sommet de la chaîne alimentaire, atteignant la maturité (stabilisation des valeurs de $\delta^{15}N$), d'un point de vue alimentaire, à une taille de 90-100 cm permettant de différencier le groupe des jeunes (<100 cm) de celui des adultes (>100 cm, voir annexe 1). La matière grasse représente 1,6 à 9,0% du poids sec des muscles et 6,7 à 57,0% du poids sec des foies, où l'accumulation des contaminants organiques dans les lipides est potentiellement favorisée.

Pour chacun des sites identifiés sur le pourtour du golfe, entre 40 et 60 oursins ont été prélevés dont la taille est comprise entre 5 et 6 cm sans les épines ainsi que 40 à 80 moules, de tailles comprises entre 3 et 8,5 cm. Pour ces deux espèces, 4 réplicats par site ont été réalisés contenant entre 10 et 20 individus différents de tailles similaires (Voir annexe 2).

Tous les échantillons sont lyophilisés (avec un lyophilisateur Christ alpha 1-4 LD plus) à -55°C puis réduits en poudre avec un broyeur à billes (Restch MM400 : 25hz pendant 1,5 min) jusqu'à obtention d'une poudre fine et homogène. Cette poudre est ensuite conservée dans des flacons HDPE de 3 à 5 g à -45°C avant analyse.

2. Méthodes d'extraction

Plusieurs techniques d'extraction inspirées de la littérature ont été comparées afin d'obtenir la méthode la plus efficace et la plus fiable possible. Les essais ont été réalisés sur des muscles de congros pêchés en 2012 (Dron et al., 2019), dont la quantité était suffisante pour réaliser les tests de développement analytique. Cette matrice test a été dopée avec une quantité connue de l'analyte 2,4,6-tribromophénol et de 2,4,5-trichlorophénol (2,4,5-TCP) servant d'étalon interne. Le 2,4,5-TCP a été choisi pour sa structure chimique et ses propriétés physico-chimiques proches de celles du 2,4,6-TBP. Il subit les mêmes pertes que l'analyte, au cours des différentes phases de l'analyse et sert de référence pour la quantification.

a) ASE : extraction accélérée par solvant

La première méthode que nous avons utilisée est l'extraction accélérée par solvants (ASE), aussi appelée extraction par liquide pressurisé (PLE). Il s'agit d'une technique d'extraction solide-liquide automatisée qui associe des températures élevées à de fortes pressions afin de garder les solvants d'extraction sous forme liquide et ainsi augmenter l'efficacité du processus. Les temps d'extraction sont relativement courts (30 minutes) et la consommation de solvants est réduite par rapport à une extraction classique au Soxhlet.



Figure 4 : ASE

Différents tests ont été effectués afin de déterminer si l'ASE était efficace pour extraire l'analyte de la matrice, tout en minimisant l'extraction de composés interférents. Les cellules ASE ont été remplies avec 2 g de matrice test dopés en 2,4,5-TCP et 2,4,6-TBP à 1 mg/L et 1 g de Na₂SO₄ mélangé à de la terre de diatomée utilisée comme agent dispersant. 6 g d'alumine ou 1 g de silice fumée ont été ajoutés dans le but de retenir les lipides présents dans la matrice. Plusieurs solvants d'extraction ont été testés, le mélange dichlorométhane/acétone (50:50), le mélange hexane/acétone (80:20), de l'acétate d'éthyle et le MTBE. Il s'est avéré que les composés d'intérêt étaient retenus par l'alumine, la silice ne permettant pas son extraction par les solvants. L'extraction ASE, sans ajout d'alumine et de silice, a été testée conduisant à une extraction importante de composés interférents. Cette méthode n'a donc pas été concluante.

b) Ultrasons

L'extraction assistée par ultrasons est un procédé qui permet l'extraction liquide-liquide et solide-liquide de n'importe quelle matrice vers le milieu d'extraction (phase liquide). L'extraction se fait dans un bain à ultrasons, favorisant la pénétration du solvant dans la matrice, ce qui va permettre aux substances présentes à l'intérieur de la matrice de diffuser vers le milieu extracteur. Cette méthode est la plus utilisée dans la littérature (Ahn et al. 2007; Hong et al. 2004; Kim et al. 2008). Toujours avec 2 g de matrice dopés en 2,4,6-TBP et 2,4,5-TCP à 1 g/L et 1 g de Na₂SO₄, plusieurs mélanges de solvants d'extraction ont été testés : dichlorométhane/acétone (50:50), hexane/acétone (20:80), et l'acétate d'éthyle (100). Le mélange dichlorométhane/acétone semble être le plus efficace pour extraire les composés. L'intensité des pics correspondant aux composés d'intérêt est plus élevée pour ce mélange de solvants et le signal sur le chromatogramme présente un faible bruit de fond. (voir annexe 3)

Cette deuxième méthode sera donc utilisée pour extraire les 2,4,5-TCP et 2,4,6-TBP des muscles des congères. Après cette étape d'extraction, le mélange est filtré sur PTFE à 0,45 µm à l'aide d'une seringue afin d'éliminer les particules résiduelles.

3. Purification des échantillons : SPE

L'extraction en phase solide (SPE) est une technique utilisée pour concentrer et purifier des analytes de matrices complexes. Le principe repose sur l'interaction des composés à extraire, entre une phase stationnaire, l'adsorbant, et une phase liquide, le solvant. Les cartouches SPE sont placées sur un manifold (cuve en verre) sur lequel est branché une pompe à vide permettant l'écoulement des échantillons à travers la cartouche.

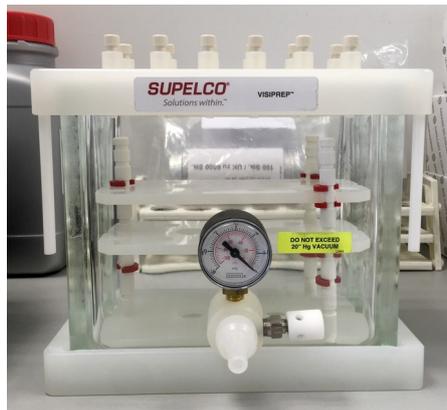


Figure 5 : Manifold d'extraction

Le protocole de purification nécessite quatre étapes. La première étape est le conditionnement de la cartouche à l'aide d'un solvant afin de préparer la phase stationnaire au passage de l'échantillon. La seconde étape est la percolation de l'échantillon contenant les analytes sur la phase stationnaire. Les molécules ayant une forte affinité avec l'adsorbant sont retenues sur la phase stationnaire tandis que les impuretés ayant peu d'affinité sont éluées par le solvant dans la phase mobile. Dans certains cas, une étape de lavage est nécessaire pour éliminer les interférents faiblement retenus par la phase stationnaire. La dernière étape est l'éluition des analytes par un solvant ou un mélange de solvants choisis pour rompre les interactions entre la phase stationnaire et les composés d'intérêt.

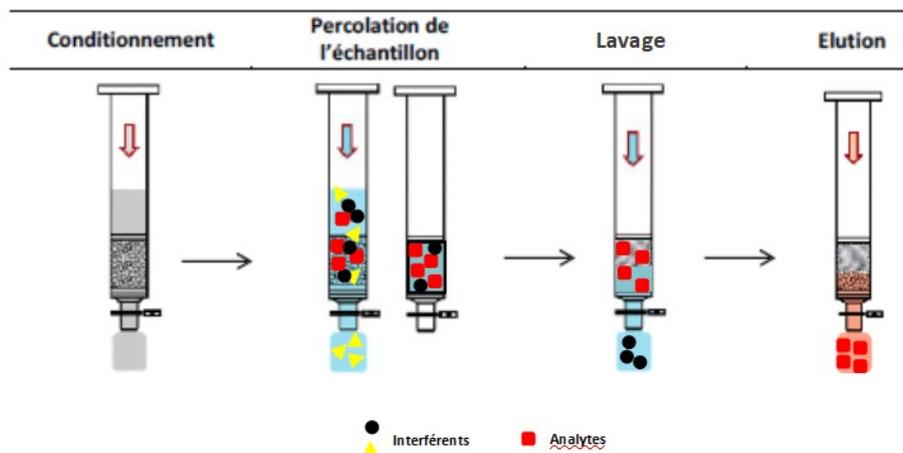


Figure 6 : Étapes d'extractions en phase solide

Premièrement, il est important de choisir l'adsorbant ayant les propriétés physico-chimiques en adéquation avec la nature de notre échantillon. En effet, plusieurs types d'adsorbant existent, cependant la Florisil est la cartouche la plus utilisée pour l'extraction de polluants organiques des matrices biologiques. (Kim et al. 2008; Ahn et al. 2007; Hong et al. 2004). La cartouche SPE Florisil est composée de gel de silice chargé d'oxyde de magnésium extrêmement polaire, permettant d'isoler les composés polaires des matrices apolaires comme, par exemple, les pesticides chlorés.

Le volume d'échantillon percolé et le choix des solvants sont d'autant plus importants. Les premiers tests ont été réalisés avec 50 mL d'échantillon (volume d'échantillon extrait) pour 1 g de phase stationnaire. Cependant les molécules d'intérêt n'étaient pas retenues sur la cartouche, éluées par le solvant de l'échantillon (Liska et al., 1990). L'échantillon a donc préalablement été évaporé sous flux d'azote liquide jusqu'à atteindre un volume de 0,5 mL repris dans 5 mL d'hexane (Ahn et al., 2007). La cartouche est conditionnée avec 6 mL d'hexane, puis les 5 mL d'échantillon sont percolés. Un lavage avec 6 mL d'un mélange de solvant hexane/acétone (75:25) (Kim et al., 2008) et une élution avec 6 mL dichlorométhane sont réalisés. Cet essai semble concluant, la matrice est purifiée mais le 2,4,6-TBP et l'étalon interne sont retrouvés dans la fraction de lavage et non dans l'élution. Afin de déterminer le volume minimal d'hexane/acétone (75:25) permettant l'élution complète du 2,4,6-TBP, nous avons effectué plusieurs ajouts de ce mélange avec différents volumes : 4 fois 3 mL (3, 6, 9, 12 mL). Nous avons conservé pour ce test, une élution finale avec 6 mL de dichlorométhane. Le composé d'intérêt est retrouvé seulement dans les deux premières fractions (3 et 6 mL) considérées comme les fractions d'élution puisqu'elles permettent au 2,4,5-TBP de se décrocher de la cartouche et d'être élué.

Volume d'élution/lavage	Aires des pics sous la courbe	
	2,4,5-TCP	2,4,6-TBP
3 mL	1328,08	406,17
6 mL	6,26	8,75
9 mL	0	0
12 mL	0	0

Tableau 1 : Détermination du volume d'élution en SPE

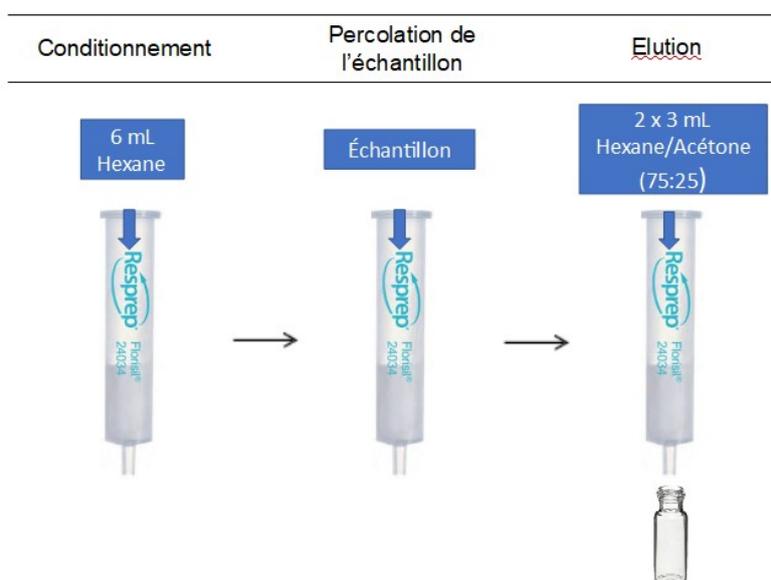


Figure 7 : Purification en phase solide du 2,4,6 tribromophénol

La purification par SPE Florisil est très concluante, en effet les rendements de la méthode varient entre 80 et 100%.

	Aires des pics sous la courbe		Rendements (%)
	2,4,5-TCP	2,4,6-TBP	
Extrait 1	1202,09	34,42	88,3
Extrait 2	1369,66	45,4	100,7
Extrait 3	1632,27	58,89	108,7
Extrait 4	1830,16	64,35	106,2
Extrait 5	1710,77	59,07	104,5

Tableau 2 : Rendements de la méthode d'extraction par SPE Florisil

4. Analyse du 2,4,6 tribromophénol par chromatographie en phase gazeuse

La dernière étape, consiste en l'analyse instrumentale permettant la séparation des composés, leur identification et la détermination quantitative du 2,4,6-TBP par chromatographie en phase gazeuse (GC) couplée à un détecteur. Deux détecteurs ont été utilisés au cours de ce développement de méthode, le spectromètre de masse (MS) et le détecteur à capture d'électrons (ECD). Le spectromètre de masse avec ionisation à impact électronique a l'avantage d'associer un spectre de masse à chaque pic chromatographique ce qui, combiné au temps de rétention, permet une identification certaine des composés analysés. Par contre, il s'avère moins sensible aux composés halogénés que le détecteur ECD. La méthode a donc été développée avec une analyse GC-MS puis la quantification dans les échantillons a été réalisée par GC-ECD. La GC-ECD est une technique utilisée pour analyser les composés halogénés d'un mélange complexe. Lorsque le mélange est injecté, les molécules sont vaporisées dans l'injecteur puis sont entraînées par un gaz vecteur (phase mobile) le long d'une colonne composée d'une phase stationnaire qui renferme une substance active. Les différentes molécules du mélange vont migrer à une vitesse propre en fonction de leur volatilité et de leur affinité avec la phase stationnaire. La vitesse de migration ou temps de rétention permet l'identification de chaque constituant du mélange.

Chromatographe	Perkin Elmer Clarus 580
Colonne	Colonne Perkin Elmer Elite-5MS de 30 m de longueur, 0,25 mm de diamètre interne, 1 um d'épaisseur de film
Gaz vecteur	Hélium à 1 mL/min, Azote 30 mL/min
Volume injecté	1,0 uL
Programme du four	Initial : 65 °C pendant 5 min Rampe 1 : 2,0 °C/min jusqu'à 240 °C Rampe 2 : 40,0 °C/min jusqu'à 310 °C pendant 10 min
Détecteur	ECD, source ⁶³ Ni

Tableau 3 : Paramètres de la GC-ECD pour la quantification du 2,4,6-TBP

La quantification des composés est basée sur le fait que l'aire des pics présents sur le chromatogramme est proportionnelle à la concentration de produit analysé. Elle nécessite la réalisation d'une gamme d'étalonnage (série de solutions étalons) à concentration croissante en 2,4,6-TBP, de 0 à 100 µg/L, et une quantité connue 100µg/L d'étalon interne, le 2,4,5-TCP dans chaque solution. Après l'analyse des solutions, on connaît l'aire de pics des deux composés :

Gamme (µg/L)	Aires de pics		
	2,4,5 TCP (100µg/L)	2,4,6 TBP	TBP/TCP
0	3239691	0	0
1	3304163,5	37849,59	0,01145512
2	4339331	91858,55	0,02116883
5	3813760,5	218098,31	0,05718721
10	3366627	419078,16	0,12448013
20	3712069,25	896390,44	0,24147999
50	3879985,25	2408689,5	0,62079862
100	3397077,25	4501689	1,32516533

Tableau 4 : Gamme étalon en GC-ECD du 2,4,5 TCP et du 2,4,6-TBP

En calculant le rapport des aires de pics, on peut tracer la droite d'étalonnage suivante :

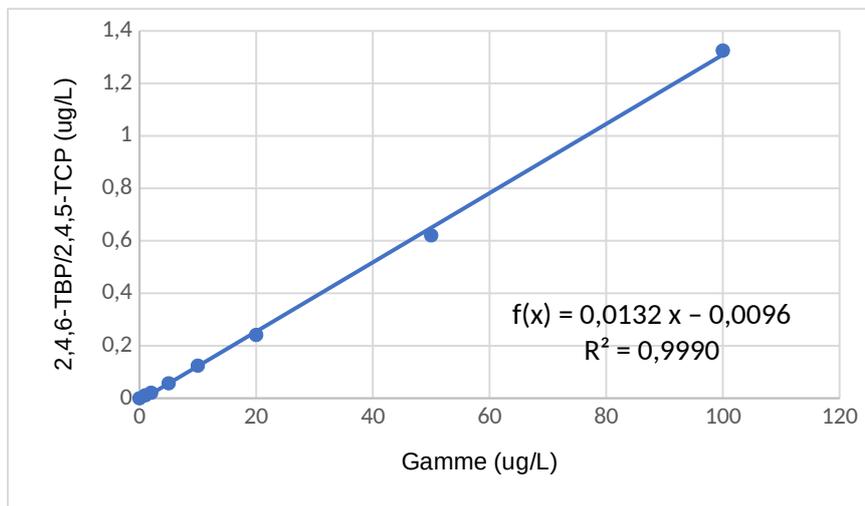


Figure 8 : Droite d'étalonnage interne de la gamme ($\mu\text{g/L}$)

L'équation de la droite d'étalonnage nous permet de déterminer la concentration inconnue en 2,4,6-TBP dans l'échantillon.

Au vu de la complexité de la matrice, et afin de réduire le bruit de fond et d'améliorer le signal, les échantillons ont été dilués par 10 avant leur analyse GC-ECD.

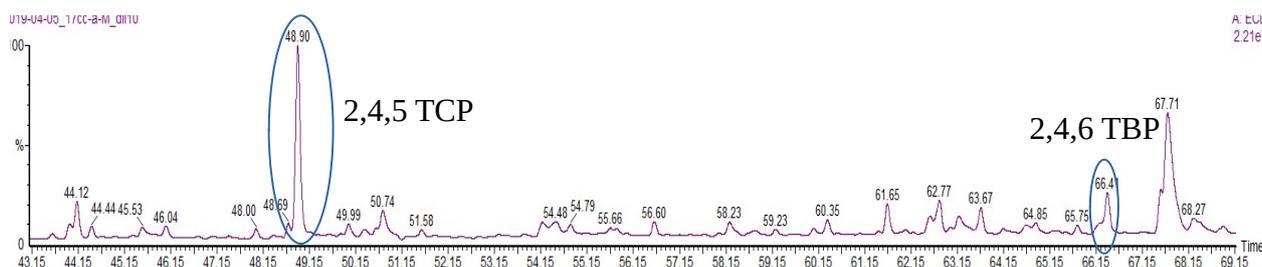


Figure 9 : Exemple de chromatogramme avec un détecteur ECD d'un muscle de congre

5. Validation de la méthode analytique

La mise au point d'une méthode analytique nécessite la validation des résultats afin d'assurer leur fiabilité. A et effet, trois critères d'évaluations sont utilisés : la répétabilité, la linéarité et le calcul des limites de détection et de quantification de la méthode.

a) La linéarité

La linéarité est la capacité d'une méthode à obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration de l'échantillon analysé. Elle a été mesurée sur une gamme de 8 points allant de 1 à 100 µg/L. En dessous de 1 µg/L, le 2,4,6-TCP n'est pas détectable. Comme on peut le voir sur la figure 8, le coefficient de corrélation est de 0,9990, la linéarité étant bonne sur cette gamme de concentration.

En raison de la complexité de la matrice poisson, la méthode des ajouts dosés à été réalisée dans les muscles des congres pêchés en 2012 afin de savoir si il n'y a pas un effet matrice sur les résultats obtenus.

Gamme Poisson (ug/L)	Aires de pics		
	2,4,5 TCP (100ug/L)	2,4,6 TBP	TBP/TCP
0	2164536,5	85481,55	0,03949185
2	3244706,5	144518,13	0,04453966
5	2161442,75	184212,05	0,08522643
10	3148986,75	560945,88	0,17813536
20	3651772,25	1245208,13	0,34098735
50	3984843	2782226,25	0,69820223
75	2808878,5	3209774,75	1,14272467
100	3528674,25	5369971	1,52180978

Tableau 5 : Gamme réalisée dans la matrice poissons (pêchés en 2014)

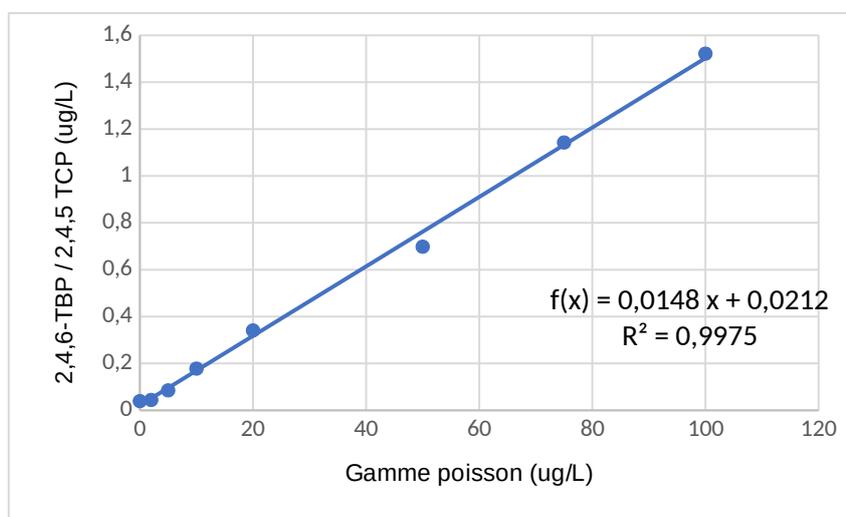


Figure 10 : Courbe étalonnage de la gamme poissons

On remarque que l'on obtient une droite d'étalonnage satisfaisante avec un R^2 proche de 1, on s'est donc affranchi de l'effet matrice lors de l'extraction. Cependant pour plus d'exactitude, nous aurions dû effectuer les ajouts dosés sur une matrice non contaminée par le 2,4,6-TBP mais nous n'avons pas de congrès disponibles pour ces essais.

b) La répétabilité

La répétabilité de la méthode est testée avec 10 répétitions de la méthode faites sur la matrice par la mesure des aires sous les pics du chromatogramme des deux solutions standards. Dans les deux cas, le coefficient de variation n'excède pas 17 %, indiquant une bonne répétabilité. Il est déterminé comme étant le rapport de l'écart-type sur la moyenne des répétitions et s'exprime en pourcentage.

	Etalon interne 2,4,5 TCP	Standard 2,4,6 TBP
1	5678451,5	443455,88
2	4525905,5	371069,94
3	5497932	412136,97
4	6226877,5	531507,38
5	5588665,5	383568,72
6	6404135	501307,13
7	5945501,5	446938,5
8	6587249,5	555120,63
9	5542117,5	402246,72
10	6803353	593813
Moyennes	5880018,85	464116,487
Ecart-types	664272,752141813	77046,0906543697
Coefficients de variations (%)	0,11	0,17

Tableau 6 : Répétabilité de la méthode

b) Limite de détection et de quantification

La limite de détection (LD) est la plus petite concentration d'analyte détectable mais pas nécessairement quantifiable. Elle est estimée comme étant 3 fois l'écart-type des répliqués. La limite de quantification (LQ) est définie comme la concentration minimale qui peut être détectée avec un coefficient de variation acceptable, il s'agit de la concentration équivalente à 10 fois l'écart-type.

	Etalon interne 2,4,5 TCP	Standard 2,4,6 TBP	TBP/TCP	[TBP]
1	5678451,5	443455,88	0,07809	6,8298
2	4525905,5	371069,94	0,08199	7,0747
3	5497932	412136,97	0,07496	6,6328
4	6226877,5	531507,38	0,08536	7,2866
5	5588665,5	383568,72	0,06863	6,2348
6	6404135	501307,13	0,07828	6,8414
7	5945501,5	446938,5	0,07517	6,6461
8	6587249,5	555120,63	0,08427	7,2184
9	5542117,5	402246,72	0,07258	6,4830
10	6803353	593813	0,08728	7,4077

Moyenne	6,8655
Ecart-type	0,3783
Rsd %	5,5097

LD ug/L TBP	1,07
LQ ug/L TBP	3,78

Tableau 7 : Détermination des LD et LQ

Les limites de détection et de quantification de la méthode obtenues à partir des solutions standards sont de : LD = 1,07 µg/L et LQ = 3,78 µg/L. Pour 2 g d'échantillon, la LD serait de 0,27 µg/kg et la LQ = 0,95 µg/kg pour les muscles de congres.

Pour les oursins, les limites de détection sont de 0,46 µg/L et 0,11 µg/kg et les limites de quantification de 1,61 µg/L et 0,40 µg/kg.

6. Protocole analytique

Le protocole retenu s'applique à l'ensemble des échantillons, muscles des congres et oursins. Cependant, au vu des contraintes de disponibilité de l'appareil de mesure, les foies des congres et les moules ne pourront pas être analysés lors de ce stage.

Dans un premier temps, toutes les extractions sont réalisées à partir d'une masse de 2 g d'échantillons dopés avec l'étalon interne. Le dopage s'effectue avec 50 µL d'une solution standard à 10 mg/L de 2,4,5 trichlorophénol diluée dans 5 mL de MTBE (Méthyl tert-butyl éther for HPLC), le but étant d'obtenir une concentration finale d'étalon interne connue de 100 µg/L dans les échantillons.

Une fois le MTBE totalement évaporé, les 2g d'échantillons dopés sont transférés dans un flacon en verre de 100 mL auquel est ajouté 1g de Na₂SO₄, afin d'éliminer toute trace d'eau restante, et 50 mL d'un mélange de solvant dichlorométhane/acétone dans les proportions (50:50).

Le mélange est extrait via les ultrasons pendant 30 minutes, puis filtré sur PTFE 0.45 µm à l'aide d'une seringue. Le mélange filtré est concentré jusqu'à un volume final de 0.5 mL sous pression d'azote liquide à 38 °C (TurboVap II). Pour augmenter l'affinité de l'analyte avec la phase stationnaire de la colonne lors de la

purification, le mélange est repris dans 5 mL d'hexane puis placé au congélateur durant 1h.

Dans un deuxième temps, nous procédons à la purification par SPE, à l'aide d'une cartouche Florisil. La cartouche est conditionnée avec 6 ml d'hexane, en veillant bien à ne pas faire sécher la phase stationnaire. L'échantillon est ensuite chargé sur la cartouche, élué goutte à goutte, puis la phase stationnaire est séchée. Nous procédons ensuite à deux lavages/élution avec 3 mL d'un mélange hexane/acétone (75:25). Les fractions de lavages sont récupérées pour être concentrées jusqu'à un volume de 0.5 mL sous pression d'azote liquide à 38°C. Pour finir, le volume est filtré puis dilué par 10 dans du MTBE avant d'être injecté en GC-ECD.

Résultats et Discussions

1. Muscles du congre

a) Influences des paramètres physiologiques sur les niveaux de contaminations.

Les concentrations en 2,4,6-TBP mesurées dans les muscles des congres sont comprises entre 8,98 et 66,46 µg/kg en poids sec. (Voir annexe 4) Les teneurs mesurées sont nettement supérieures à celles retrouvées dans la littérature, les valeurs moyennes indiquant des concentrations allant de 2,80 à 10,39 µg/kg de poids total dans les muscles des congres pêchés en 2012 dans la même zone d'étude (Boudjellaba et al. 2016), de 2,4 à 21,8 µg/kg de poids sec de muscles chez une espèce de mérrou (*Epinepheus areolatus*), (Chung et al. 2003), et de 0,8 à 16,4 µg/kg en poids sec dans les muscles de certaines espèces carnivores benthiques et pélagiques (Whitfield et al.1998). On peut donc affirmer que les concentrations mesurées dans les muscles des congres sont essentiellement de nature anthropique et probablement liées aux rejets industriels d'eaux chlorées. (Boudjellaba et al. 2016).

Cependant, les concentrations en 2,4,6-TBP dans les muscles varient d'un congre à un autre au sein d'une même zone géographique. On observe, par exemple, des variations allant de 14,55 à 66,46 µg/kg en poids sec au niveau de la station 17 (Carteau). Afin de les expliquer, il est important de faire une analyse statistique avec le logiciel R dans le but de mettre en évidence l'influence des paramètres physiologiques sur les teneurs en 2,4,6-TBP mesurées.

Toutes les variables physiologiques, taille, poids, matière grasse, rapports isotopiques du carbone et de l'azote, ont été comparées à la concentration en 2,4,6-TBP par analyse des résultats de régression linéaire. Individuellement, seule la matière grasse présente une corrélation acceptable avec le 2,4,6-TBP ($p=0,06$ et $R^2=0.16$).

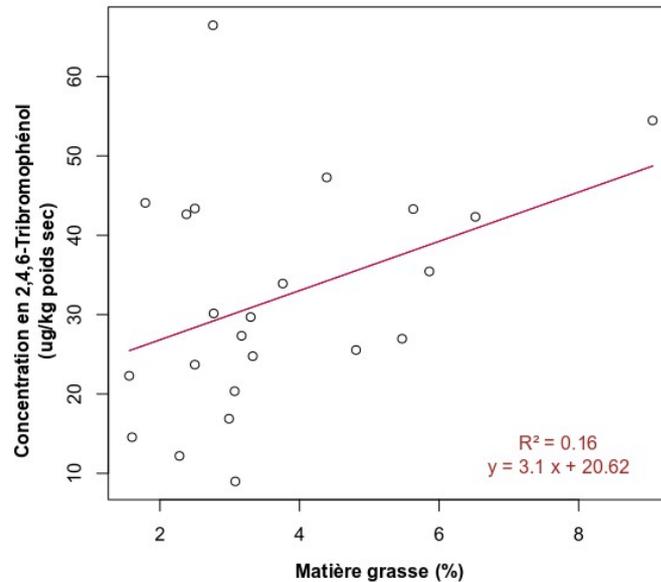


Figure 11 : Concentrations en 2,4,6-TBP en fonction de la matière grasse des congres

Il est possible d'intégrer d'autres paramètres au modèle linéaire et de réaliser ainsi une régression linéaire multiple. Cette technique permet d'intégrer dans le même modèle autant de paramètres explicatifs que souhaité, et même d'étudier l'incidence de leurs interactions. Appliquée ici aux paramètres de taille, matière grasse, d15N et d13C (sans interactions) pour décrire la variation de concentration en 2,4,6-TBP dans les muscles de congres, il ressort significativement la taille et la matière grasse ($p < 0.05$). A ce stade, l'étude des interactions entre paramètres n'apporte pas de réponse. Cependant, lorsqu'on affine le modèle à ces deux paramètres, on obtient des résultats qui expliquent environ 32% de la variance en 2,4,6-TBP, où l'influence de la matière grasse ressort notamment ($p < 0.01$). Cette observation est en accord avec la littérature, dont certains auteurs affirment que le 2,4,6-TBP serait mieux accumulé dans les lipides. (Chung et al. 2003; Whitfieds et al. 1998). Ces résultats présentent donc une influence de certains paramètres physiologiques sur les teneurs en 2,4,6-TBP dans les muscles de congres. Les concentrations en 2,4,6-TBP semblent augmenter chez les congres ayant un taux de matière grasse plus élevé, notamment lorsqu'il dépasse 4% de poids sec. Afin de vérifier si les effets des autres paramètres biologiques auraient été masqués par le lien entre le 2,4,6-TBP et la matière grasse, les concentrations en 2,4,6-TBP sont normalisées par rapport à la matière grasse. A ce stade, on remarque qu'il y a une corrélation avec le paramètre «taille» ($p < 0,001$) qui explique pour 43% de la variance ($R^2 = 0,43$).

Les niveaux de contamination en 2,4,6-TBP corrigés par la matière grasse sont plus élevés chez les congres juvéniles ($< 100\text{cm}$). Ces différences entre les catégories jeunes et adultes pourraient résulter d'une différence de métabolisme, les jeunes auraient alors un métabolisme plus efficace pour l'accumulation du 2,4,6-TBP par l'organisme. De même d'autres polluants, comme les métaux (Cr, Ni, Mn, Al, Fe) ou les PCB

faiblement chlorés (3 et 4 Cl) présentait également des concentrations plus élevées selon les mêmes classes de tailles dans les congres pêchés en 2012 lors d'une précédente étude de la contamination du milieu marin dans le Golfe de Fos. (Dron et al. 2019).

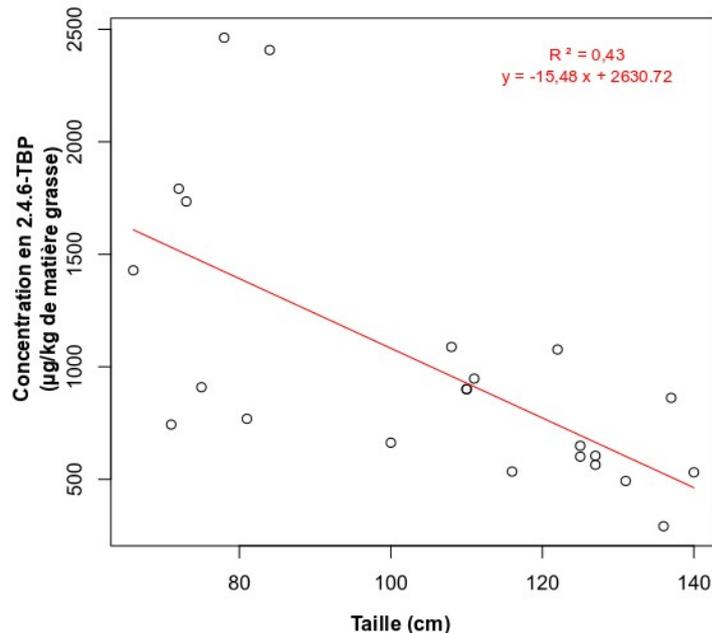


Figure 12 : Concentrations en 2,4,6-TBP après correction de l'effet de la matière grasse en fonction de la taille des congres

Par ailleurs, au cours de cette précédente étude sur des muscles de congres, le 2,4,6-TBP avait été recherché dans 15 individus de taille > 100 cm. C'est probablement cette restriction aux poissons adultes qui a fait qu'aucune corrélation avec la taille n'ait été observée, l'incidence de ce paramètre devenant alors mineure. De la même manière, la matière grasse mesurée dans les muscles de ces poissons était très faible, comprise entre 0,1 et 1,2%, réduisant probablement aussi l'impact de ce facteur.

b) Influences de la zone géographique

Dans le cadre de cette étude, le Golfe de Fos est séparé en trois zones distinctes, une zone Ouest située à l'ouest de la ville de Fos sur les rives de Lavéra et de Port-de-Bouc, une zone Est, à l'est d'une ligne reliant la pointe de la Gracieuse au port de plaisance Fos-Saint-Gervais et une troisième zone correspondant aux sites de pêche à l'intérieur des darses 1, 2 et 3. L'analyse des rapports isotopiques en fonction de la situation géographique montrent un isolement significatif des individus provenant de chacune des 3 zones prédéfinies, notamment selon des niveaux de $\delta^{15}\text{N}$ marqués ($p < 0,001$). Comme les données sont préalablement normalisées par rapport à la taille des individus, ce sont principalement l'influence des eaux continentales et l'incidence des variations spatiales naturelles qui expliquent les variations de $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$.

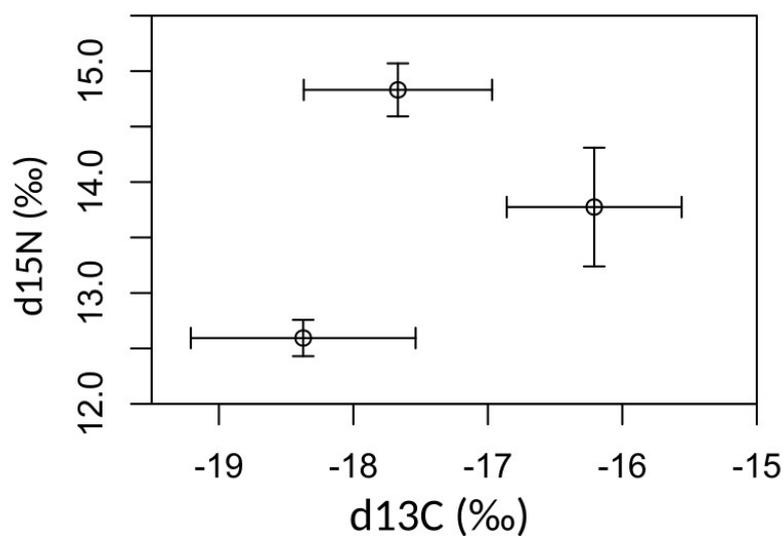


Figure 13 : Valeurs moyennes des rapports isotopiques $\delta^{15}\text{N}$ (en ordonnées) et $\delta^{13}\text{C}$ (en abscisses) (‰) après correction de l'effet de taille. Les barres indiquent les intervalles de confiance à 95 %.
Source : Pantalacci 2018

Cependant, les niveaux de concentration en 2,4,6-TBP dans les muscles sont assez homogènes sur la zone d'étude, même si la valeur médiane est plus élevée dans les darses. Les moyennes des concentrations d'un site à l'autre sont relativement proches entre 33,19 et 37,68 $\mu\text{g}/\text{kg sec}$ pour les stations Carteau, Eoliennes, Cycofos, Lavéra, d'autant plus qu'au sein d'un même site l'écart-type des concentrations est de l'ordre de 20 $\mu\text{g}/\text{kg sec}$. (voir tableau 8 & figure 14).

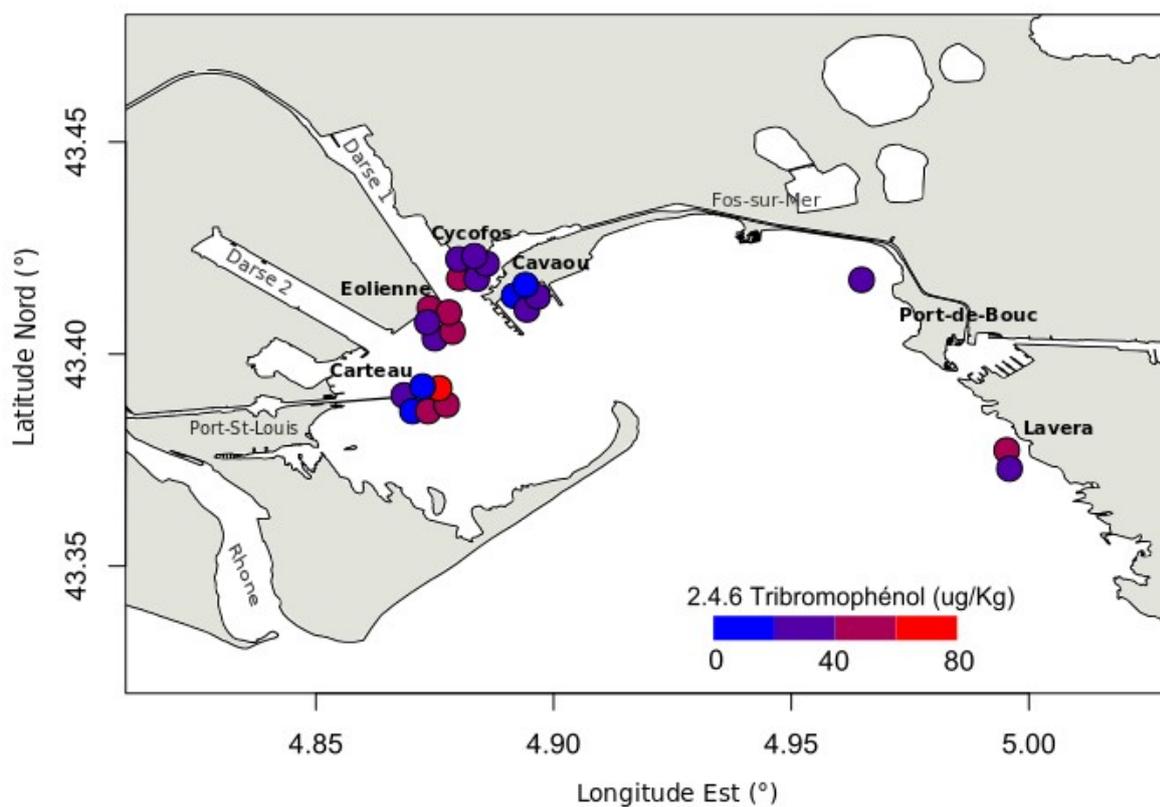


Figure 14 : Concentrations ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de poids sec) dans les muscles de congre selon leur localisation dans le Golfe de Fos

	Moyennes des concentrations en 2,4,6-TBP ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Écart-types des concentrations en 2,4,6-TBP ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Carteau	35,68	19,42
Eoliennes	37,74	10,61
Cycofos	33,82	12,12
Cavou	18,42	9,16
Port-de-Bouc	24,76	-
Lavera	33,19	15,41

Tableau 8 : Valeurs moyennes et écarts-types en $\mu\text{g}/\text{kg}$ des concentrations dans les muscles de congre pour chaque zone d'étude

Les concentrations corrigées par la matière grasse ne permettent pas non plus de dégager une tendance géographique.

Lorsqu'on compare les concentrations en 2,4,6-TBP identifiées dans les muscles de congres aux valeurs retrouvées dans les eaux du golfe, on remarque qu'il y a une distribution cohérente pour certaines zones (Eoliennes, Cycofos, Cavaou, Lavéra) à proximité des rejets d'eaux de chloration. Les stations 7, 8, 10, 11 et 12 sont celles où le 2,4,6-TBP a été mesuré dans les eaux, pour des valeurs comprises entre 0,030 et 0,157 $\mu\text{g/L}$. (voir figure 15). Lors de la précédente étude, des concentrations plus élevées ont été retrouvées chez les individus pêchés dans les darses du port à proximité des exutoires (Dron et al, 2019).

Au niveau des stations Carteau et Port-de-Bouc, situées plus loin des rejets de chlore, des concentrations moyennes plus basses en bromoforme dans l'eau ont été mesurées sur les 6 campagnes de prélèvements de l'ordre de 0,45 $\mu\text{g/L}$ (point 3), et 0,033 $\mu\text{g/L}$ (point 14), par rapport aux exutoires (voir annexe 6). Cependant il reste difficile de dégager une tendance pour ces deux zones.

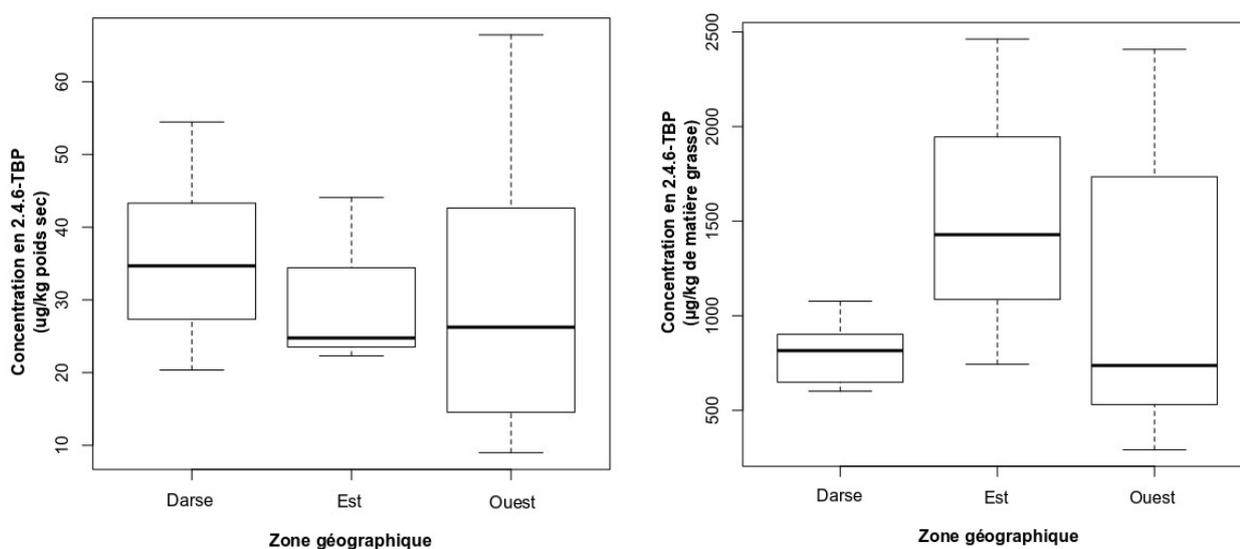


Figure 15 : Concentrations en 2,4,6-TBP en fonction de la zone géographique (à gauche), Concentration corrigée par la matière grasse en fonction de la zone géographique (à droite). La zone Darse rassemble les stations : Eoliennes et Cycofos, à l'Est la zone Lavéra-Port-de-Bouc et à l'Ouest les zones Carteau et Cavaou

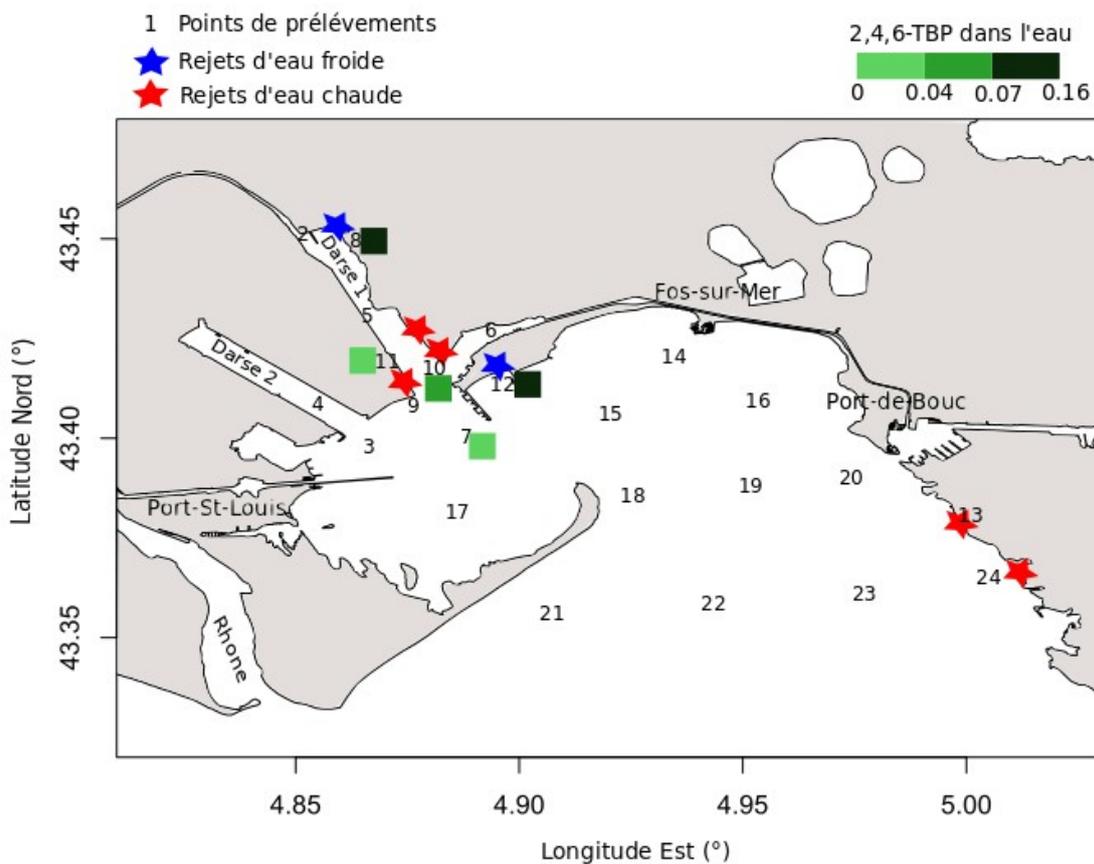


Figure 16 : Répartition géographique des concentrations en 2,4,6-TBP ($\mu\text{g/L}$) dans les eaux du Golfe de Fos (moyennes des concentrations mesurées sur les 6 campagnes de prélèvements d'eau de mer, station 7= $0,03\mu\text{g/kg}$, 8= $0,153\mu\text{g/kg}$, 10= $0,067\mu\text{g/kg}$, 11= $0,035\mu\text{g/kg}$, 12= $0,157\mu\text{g/kg}$)

2. Oursins

a) Influences des paramètres physiologiques sur les niveaux de contaminations

Les concentrations en 2,4,6-TBP mesurées dans les gonades et l'appareil digestif des oursins sont comprises entre 62,11 et 205,31 µg/kg en poids sec (voir annexe 5). Ces valeurs sont significativement supérieures à celles retrouvées dans les muscles des congres. On peut noter que les oursins contiennent plus de matière grasse (9,1 à 15,1%) que les muscles de congres, ce qui peut favoriser l'accumulation de contaminants organiques comme le 2,4,6-TBP. Il n'existe aucune étude mentionnant des concentrations en 2,4,6-TBP pour les oursins dans la littérature scientifique. Les mêmes études qui ont mesuré le 2,4,6-TBP dans les poissons ont observé des valeurs très inférieures dans les crevettes (Whitfield et al. 1997, Chung et al. 2003) mais globalement plus élevées dans les crabes, allant de 38 à 2360 µg/kg poids sec (Chung et al. 2003). Cela dit, les grandes variations observées par ces auteurs au sein d'une même espèce, leur nature éloignée des oursins, et les différences méthodologiques importantes rendent la comparaison relativement hasardeuse. On constate que les données concernant le 2,4,6-TBP dans les organismes marins sont très rares et, même, aucune nouvelle mesure ne semble avoir été publiée depuis 2003, à l'exception des congres du Golfe de Fos pêchés en 2012 (Boudjellaba et al. 2016).

Aucune corrélation pour les concentrations en 2,4,6-TBP n'a été mise en évidence directement avec la matière grasse, la taille, le poids et l'indice gonadique. Ce dernier est calculé à partir du poids des gonades et de l'organisme entier (IG = poids des gonades/poids total). Seules les gonades avaient été pesées, mais on peut estimer assez précisément le poids total à partir de la relation taille/poids des oursins : poids total = a*taille^b. La taille ayant été mesurée, le poids total est déterminé en faisant la moyenne des coefficients a et b retrouvés dans la littérature (Grojean, 2001; Kucukdermenci, 2014). Le poids total est ainsi exprimé par la relation : 0,2068 * taille^{2,102}.

En corrigeant l'effet de la matière grasse sur la concentration en TBP comme pour les muscles du congre, on remarque qu'il y a une corrélation linéaire significative avec le poids (p = 0,0142, r² = 0,24).

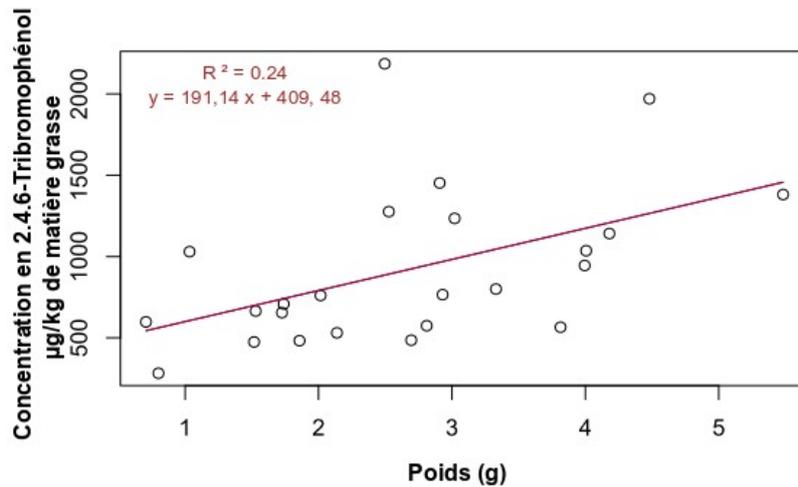


Figure 17 : Concentrations en 2,4,6-TBP après correction de l'effet de la matière grasse (ug/kg) en fonction du poids des oursins

b) Influence de la zone géographique

Comme pour les congères, les concentrations mesurées en 2,4,6-TBP sont assez homogènes en fonction de la zone de prélèvement, les écarts-types des concentrations au sein d'un même site sont aussi inférieurs à 21 µg/kg poids sec sauf pour la station Gloria (38,77 µg/kg poids sec). Cela représente une variabilité sur le sous-échantillonnage d'un même site (N=4) très satisfaisante et inférieure à 26%, à l'exception de Port-de-Bouc (56%) où les concentrations mesurées sont les plus faibles. Sur la zone d'étude, les sites où les plus fortes concentrations en 2,4,6-TBP (>100 µg/kg poids sec) ont été retrouvées, se situent chez les individus pêchés aux stations Gloria, Port-de-Bouc, et Ponteau. (voir tableau 9). Ces zones ne se trouvent pas à proximité des rejets de chlore, excepté Ponteau. (voir figure 15)

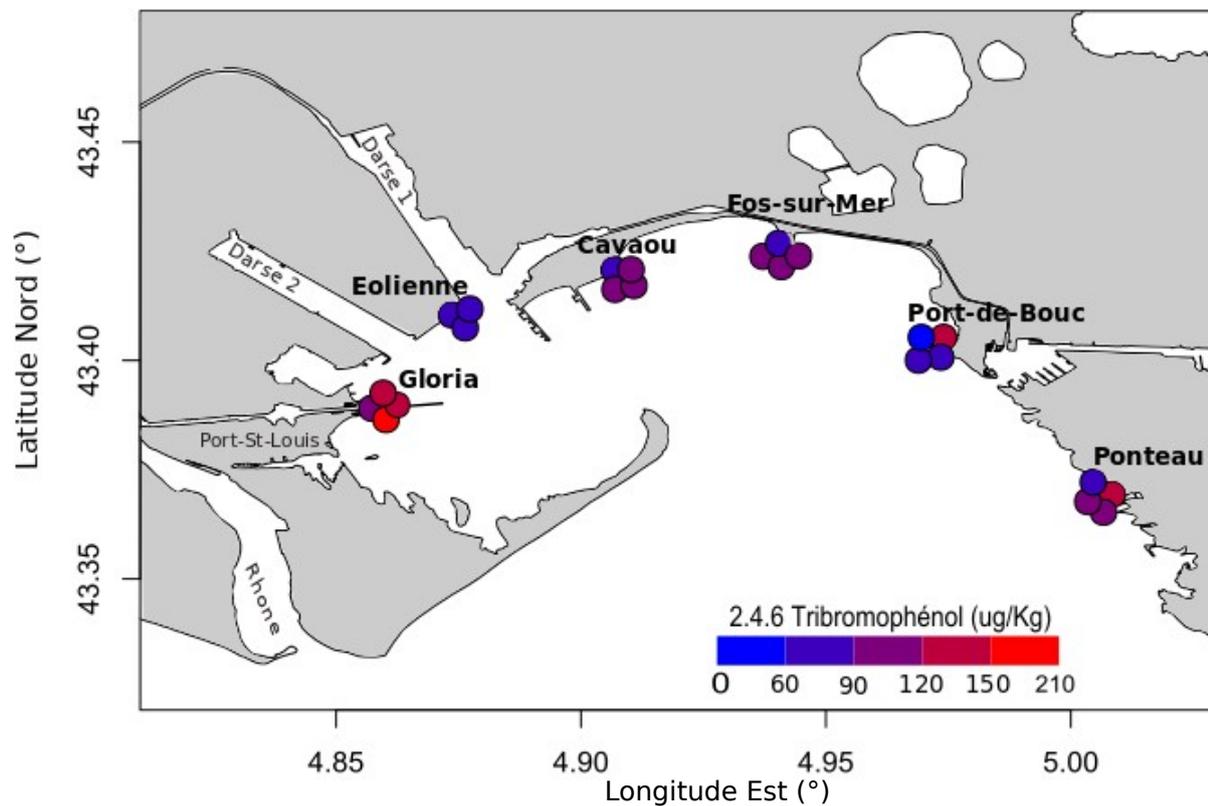


Figure 18 : Concentrations ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de poids sec) dans les oursins selon leur localisation dans le Golfe de Fos

	Moyennes des concentrations en 2,4,6-TBP ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Écarts-types des concentrations en 2,4,6-TBP ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Gloria	149,24	38,77
Eolienne	75,65	6,83
Cavaou	94,71	15,00
Fos-sur-Mer	104,41	18,05
Port-de-Bouc	36,98	20,79
Ponteau	106,81	20,91

Tableau 9 : Valeurs moyennes et écarts-types en $\mu\text{g}/\text{kg}$ des concentrations dans les oursins pour chaque zone d'étude

Les concentrations corrigées par la matière grasse puis par le poids ne permettent pas non plus de dégager une tendance géographique.

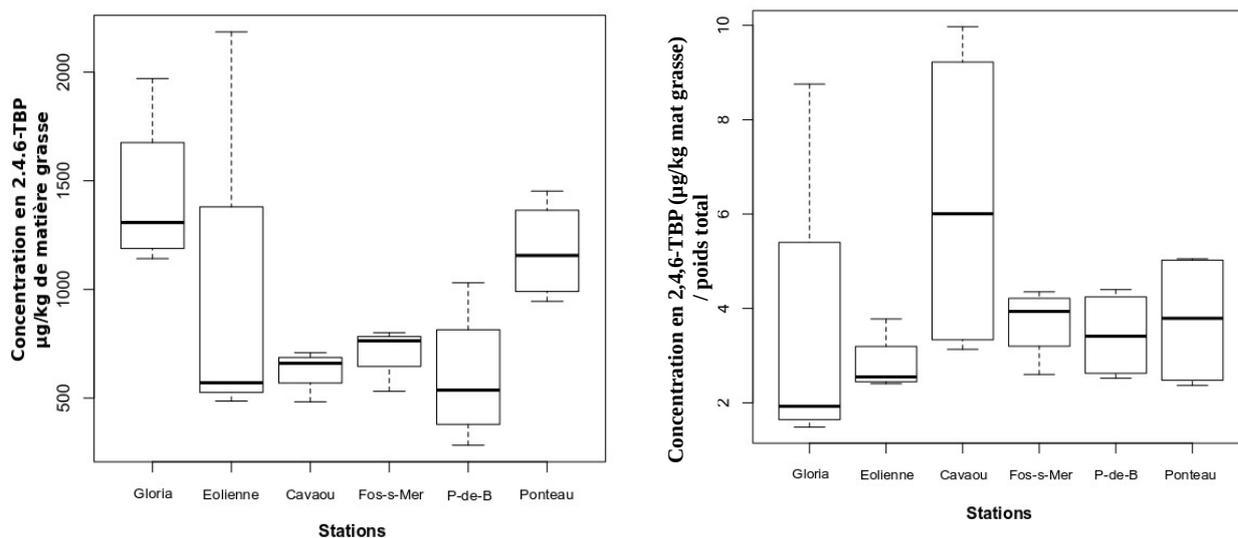


Figure 19 : Concentrations en 2,4,6-TBP corrigées par la matière grasse en fonction des stations de prélèvements (à gauche), Concentrations corrigées par la matière grasse puis par le poids en fonction des stations de prélèvements (à droite). La zone Darse rassemble les stations : Éolienne, l'Est la zone Ponteau, Port-de-Bouc, Fos-sur-Mer et l'Ouest les zones : Gloria et Cavaou

Au niveau de la station Ponteau, des concentrations moyennes (surface et profondeur) en bromoforme ont été retrouvées de l'ordre de 0,32 µg/L (point 24). Pour les stations Éoliennes et Cavaou, situées dans des rejets connus de chlore, des concentrations moyennes de 2,65 µg/L (site 12) et 1,83 µg/L (site 9) en bromoforme dans l'eau ont été mesurées sur les 6 campagnes. (voir annexe 6)

Si la station Gloria ressort légèrement dans les valeurs rapportées au poids sec et à la matière grasse des oursins, c'est sur le site de Cavaou qu'on relève les valeurs les plus élevées lorsqu'on normalise à la taille et à la matière grasse. Cependant, les différences restent limitées. Il est donc difficile d'expliquer une relation de cause à effet des teneurs en bromoforme ou en 2,4,6-TBP retrouvées dans les eaux du Golfe sur les contaminations en 2,4,6-TBP chez les oursins. Cela indique que le sujet est complexe et nécessite des travaux complémentaires pour mieux comprendre l'accumulation du 2,4,6-TBP dans les organismes marins.

Conclusion

L'objectif principal de ce stage était la mise au point de la méthode d'analyse des halophénols dans les organismes marins du Golfe de Fos. Ce sujet s'inscrivant dans le cadre du projet FOS-SEA de l'Institut Ecocitoyen et du LCE, il s'est avéré nécessaire de développer une méthode appropriée pour étudier la bioaccumulation du 2,4,6-tribromophénol (2,4,6-TBP) chez les espèces marines sélectionnées pour cette étude, les moules, les oursins et les congres. D'un point de vue technique, ces matrices étaient assez difficiles à exploiter car très peu d'études ont été réalisées sur le sujet.

Après plusieurs essais, l'extraction par les ultrasons du 2,4,6-TBP a été privilégiée, suivie d'une étape de purification par SPE Florisil. La détection des composés s'est effectuée par la GC-ECD qui présente une sensibilité plus fine aux molécules halogénées. La fiabilité de la méthode a été évaluée par linéarité, répétabilité et la détermination des limites de détection et de quantification. Les résultats démontrent de la fiabilité de la méthode d'analyse avec des rendements supérieurs à 80%.

La méthode d'analyse a été appliquée aux échantillons marins, muscles de congres et oursins, où les concentrations en 2,4,6-TBP ont pu être déterminées. Il s'est avéré que les oursins avaient un taux en 2,4,6-TBP plus élevé que dans les muscles du congre. On peut noter que les oursins ont un taux de matière grasse plus important, ce qui peut favoriser la bioaccumulation. C'est d'ailleurs avec la matière grasse que la concentration en 2,4,6-TBP a montré le plus de corrélation au sein de chaque espèce. Chez les congres, la concentration normalisée à la matière grasse semble généralement plus élevée chez les jeunes. Cette différence de concentration pourrait être expliquée par un changement de mode de vie ou un métabolisme d'élimination différent de ce polluant en particulier.

Au niveau de l'influence de la zone géographique, il n'y a pas de tendance clairement établie pour les 3 zones du Golfe de Fos prédéfinies (Darse, Est, Ouest). Malgré une homogénéité des teneurs en 2,4,6-TBP selon leur site de prélèvement, la présence des concentrations élevées éloignées des exutoires reste à préciser. Répéter les mesures et les étendre à d'autres espèces ou à d'autres lieux non-exposés, par exemple, permettraient de confirmer et de préciser l'origine du 2,4,6-TBP retrouvé dans les organismes du Golfe de Fos.

L'analyse future des taux de contamination dans les moules et dans le foie des congres pourra permettre d'étayer les résultats et de mieux comprendre la diffusion du 2,4,6-TBP dans le golfe et la bioaccumulation dans les organismes marins. Ces résultats pourraient, par la suite, témoigner d'une possible toxicité des rejets chlorés sur les organismes marins notamment sur les populations de poissons et ainsi aboutir à la mise en œuvre d'une législation sur les rejets d'eaux chlorées à ce jour inexistante.

Bibliographie

Abarnou A., (1981). Trihalométhanes formés par chloration de l'eau de mer. In 2èmes journées de la thermoécologie, Nantes, 14-15 novembre 1979. Electricité de France Ed., 247-266

Andral B, Stanisiere JY, Sauzade D, Damier E, Thebault H, Galgani F, Boissery P, (2004). Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging, Mar Pollut Bull, 2004 Nov;49(9-10):704-12.

ANSES (2016). Valeurs toxicologiques de référence (VTR). <https://www.anses.fr/fr/content/valeurstoxicologiques-de-r%C3%A9f%C3%A9rence-vtr>

Boudjellaba, D.; Dron, J.; Revenko, G.; Démelas, C. and Boudenne, J.-L. (2016). Chlorination by-product concentration levels in seawater and fish of an industrialised bay (Gulf of Fos, France) exposed to multiple chlorinated effluents, Science of The Total Environment 541 : 391 - 399.

Chung, H. Y.; Joyce Ma, W. C. and Kim, J.-S. (2003). Seasonal Distribution of Bromophenols in Selected Hong Kong Seafood, Journal of Agricultural and Food Chemistry 51 : 6752-6760.

Deng, J.; Liu, C.; Yu, L. and Zhou, B. (2010). Chronic exposure to environmental levels of tribromophenol impairs zebrafish reproduction , Toxicology and Applied Pharmacology 243 : 87 - 95.

Dron, J.; Revenko, G.; Chamaret, P.; Chaspoul, F.; Wafo, E.; Harmelin-Vivien, M. (2019). Contaminant signatures and stable isotope values qualify European conger (*Conger conger*) as a pertinent bioindicator to identify marine contaminant sources and pathways, Ecological Indicators 107 (2019) 105562.

Duchez, A. (2011). Contrôle du courant Nord Méditerranéen dans le golfe du Lion: une approche par simulation du système d'observation, Université du Sud Toulon Var.

Gramaglia, C and Melard, F, (2019). Looking for the Cosmopolitical Fish: Monitoring Marine Pollution with Anglers and Congers in the Gulf of Fos, Southern France, Science, Technology, & Human Values 1-29.

Gorjean, P., 2001. Growth model of the reared sea urchin *Paracentrotus lividus*. FACULTE DES SCIENCES LABORATOIRE DE BIOLOGIE MARINE.

Jongki Hong, Hye-Young Kim, Do-Gyun Kim, Jungju Seo, Kang-Jin Kim. (2004). Rapid determination of chlorinated pesticides in fish by freezing-lipid filtration, solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 1038 27-35.

Küçükdermenci, A. and Lök, A. 2014. MORPHOMETRIC RELATIONSHIPS AND VARIABILITY OF ANNUAL BODY CONDITION OF SEA URCHIN (*Paracentrotus lividus* - Echinodermata: Echinodermata) AT FOCA COAST IN THE SOUTH AEGEAN SEA, PSP Volume 23 – No 10. 2014.

Lebaron, K.; Mechiri, L.; Richard, S.; Austruy, A.; Boudenne, J.L.; Coupé, S. (2019). Assessment of individual and mixed toxicity of bromoform, tribromoacetic-acid and 2,4,6 tribromophenol, on the embryo-larval development of *Paracentrotus lividus* sea urchin. Environmental Science and Pollution Research, Published online: 18 May 2019.

MENET-NEDELEC, F.; GONZALEZ, J.-L.; HALM-LEMEILLE, M.-P.; REPECAUD, M.; FACQ, J.-V.; MAHEUX, F.; PIERRE-DUPLESSIX, O.; SIMON B.; 2018. Etude d'outils d'évaluation de la contamination chimique dans les eaux de la manche, Rapport Ifremer ODE/UL/LERN/18-02.

Min-Sun Kim, Kwang-Sik Park, Heesoo Pyo, and Jongki Hong. (2008). Rapid Determination of Chlorostyrenes in Fish by Freezing-Lipid Filtration, Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry, Bull. Korean Chem. Soc., Vol. 29, No. 2.

Pantalacci A. (2018). caractérisation physiologique, isotopique et dosage des halophénols dans trois organismes marins du Golfe de Fos, Rapport de Stage M2 Sciences et Technologies (Aix-Marseille Université).

Pinazo, C.; Fraysse, M.; Doglioli, A.; Faure, V. M.; Pairaud, I.; Petrenko, A.; Thouvenin, B.; Tronczynski, J.; Verney, R. and Yohia, C. (2013). MASSILIA: Modélisation de la baie de MARSELLe : Influence des apports Anthropiques de la métropole sur l'écosystème marin. IFREMER.

Ulses, C.; Grenz, C.; Marsaleix, P.; Schaaff, E.; Estournel, C.; Meulé, S. and Pinazo, C. (2005). Circulation in a semi-enclosed bay under influence of strong freshwater input, Journal of Marine Systems 56 : 113 - 132.

Yun Gyong Ahn, Jeoung Hwa Shin, Hye-Young Kim, Jeehyeong Kim, Mi-Kyoung Lee, Jongki Hong, (2007). Application of solid-phase extraction coupled with freezing-lipid filtration clean-up for the determination of endocrine-disrupting phenols in fish, Analytica Chimica Acta Volume 603, Issue 1, 5 November 2007, Pages 67-75.

ANNEXES

Annexe 1 : Relation taille-poids des 23 congres pêchés, courbe représentant le poids brut en fonction de la longueur totale des congres. (Source : Pantalacci A., 2018).

Annexe 2 : Nombre d'individus pêchés par station au sein du Golfe de Fos.
(Source : Pantalacci A., 2018).

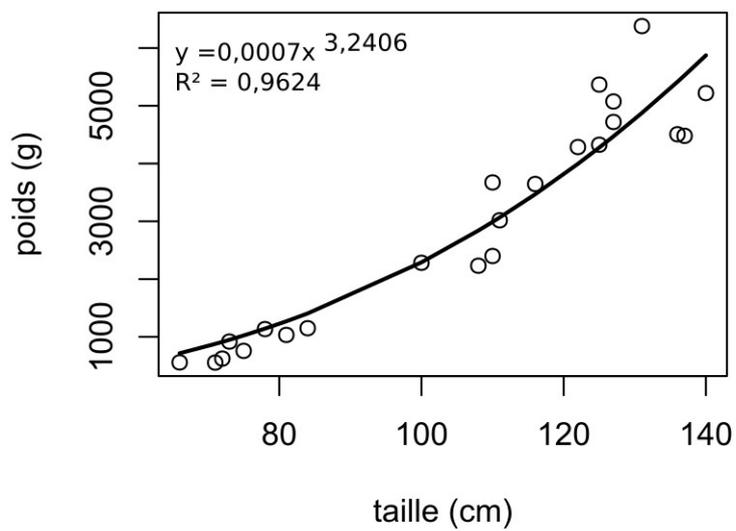
Annexe 3 : Tests des solvants d'extractions par ultrasons : Hexane/Acétone (80/20), Acétate d'éthyle (100%), Dichlorométhane/Acétone (50/50) en GC-MS.

Annexe 4 : Résultats détaillés des paramètres physiologiques et biologiques dans les muscles du congre.

Annexe 5 : Paramètres physiologiques et biologiques des oursins.

Annexe 6 : Concentrations en bromoforme retrouvées dans les eaux du golfe en $\mu\text{g/L}$ sur les 6 campagnes de prélèvements d'eau de mer, et carte avec la localisation des points de prélèvements.

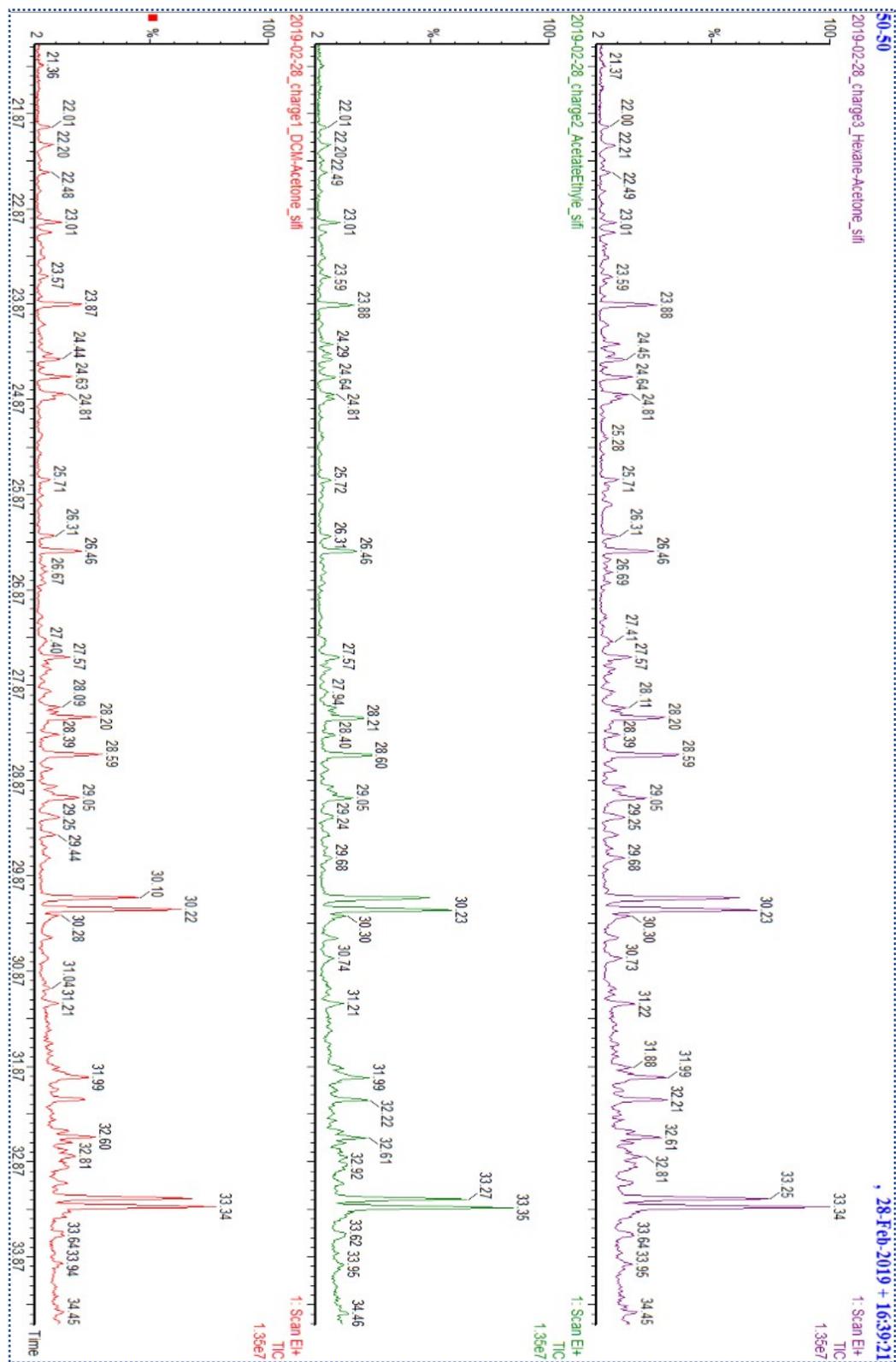
Annexe 1 : Relation taille-poids des 23 congres pêchés, courbe représentant le poids brut en fonction de la longueur totale des congres. (Source : Pantalacci A., 2018)



Annexe 2 : Nombre d'individus pêchés par station au sein du Golfe de Fos.
(Source : Pantalacci A., 2018)

COMMUNE	Zone	Station	Muscles de Congre	Foies de Congre	Oursins	Moules
FOS-SUR-MER	EOLIENNE	9	5	5	40	60
	SAINT-GERVAIS	14			60	80
	CAVAOU	12	4	4	60	48
	TONKIN	8				48
	CYCOFOS	11	5	5		60
	GPM	7				59
PORT-DE-BOUC	LES LECQUES	16	1		47	80
PORT-SAINT-LOUIS	GLORIA	3			40	62
	CARTEAU	17	6	6		57
MARTIGUES	LAVERA	13	2	2		60
	PONTEAU	24			40	
TOTAL			23	22	287	614

Annexe 3 : Tests des solvants d'extractions par ultrasons : Hexane/Acétone (80/20), Acétate d'éthyle (100%), Dichlorométhane/Acétone (50/50) en GC-MS



Annexe 4 : Résultats détaillés des paramètres physiologiques et biologiques (Pantalacci, 2018) et des concentrations en 2,4,6-TBP dans les muscles du congre

Code	Taille	Poids	Age calculé	Matière grasse	Teneur en eau	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	C/N	[TBP]
	cm	g		%	%	‰	‰		µg/kg
13cc-b	66	557	3,49	1,56	71,2	12,9	-17,9	3,13	22,29
16cc-a	71	554	3,96	3,33	76,5	12,7	-17,5	3,03	24,76
17cc-c	72	623	4,05	2,38	77,0	13,8	-14,8	3,16	42,64
17cc-d	73	918	4,14	2,50	76,1	14,5	-16,0	3,21	43,37
17cc-f	75	757	4,34	1,60	75,4	14,8	-16,3	3,05	14,55
13cc-a	78	1134	4,63	1,79	78,6	13,0	-18,9	3,15	44,08
9cc-a	81	1033	4,92	5,63	77,9	15,7	-19,1	3,23	43,30
17cc-e	84	1149	5,22	2,76	76,3	13,6	-16,5	3,14	66,46
9cc-e	100	2282	6,91	3,07	78,4	15,0	-17,4	3,15	20,35
17cc-a	108	2231	7,83	2,77	78,3	14,7	-16,7	3,12	30,15
11cc-c	110	3673	8,06	3,76	77,7	15,2	-18,9	3,16	33,91
11cc-e	110	2399	8,06	3,30	76,0	15,8	-16,7	3,19	29,69
11cc-d	111	3018	8,18	2,50	77,0	15,5	-14,6	3,15	23,69
12cc-d	116	3646	8,79	2,28	78,3	14,1	-16,9	3,13	12,19
9cc-d	122	4286	9,55	4,39	76,7	15,4	-18,9	3,43	47,28
11cc-a	125	5367	9,95	9,06	75,4	15,2	-16,8	3,89	54,46
9cc-c	125	4326	9,95	6,52	76,3	15,6	-15,9	3,40	42,32
17cc-b	127	4720	10,21	2,99	77,9	13,3	-14,9	3,17	16,88
9cc-b	127	5075	10,21	5,86	76,7	15,6	-17,7	3,28	35,44
12cc-c	131	6380	10,76	5,47	78,2	15,2	-18,2	3,29	26,96
12cc-a	136	4507	11,47	3,08	78,3	14,9	-15,5	3,15	8,98
11cc-b	137	4480	11,62	3,17	76,6	15,7	-16,4	3,23	27,33
12cc-b	140	5220	12,06	4,81	78,1	15,1	-18,0	3,33	25,54

Annexe 5 : Paramètres physiologiques et biologiques des oursins (Pantalacci 2018) et concentrations en 2,4,6-TBP

CODE	Taille	Poids	Nombre d'échantillons	Matière grasse	Teneur en eau	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	[TBP]
	cm	g		%	%	‰	‰	µg/Kg
9pl-a	5,27	24,96	10		76,00	NA	NA	304,86
9pl-b	5,51	38,14	10		82,66	NA	NA	78,94
9pl-c	5,31	26,95	10	13,95	77,75	NA	NA	67,80
9pl-d	5,54	28,11	10		76,05	NA	NA	80,21
14pl-a	5,37	29,3	10		70,01	NA	NA	111,91
14pl-b	5,73	66,6	20		73,97	NA	NA	116,96
14pl-c	5,27	32,07	15	14,61	70,26	NA	NA	77,61
14pl-d	5,15	30,23	15		68,71	NA	NA	111,17
16pl-a	5,36	12,4	12		71,41	NA	NA	134,67
16pl-b	4,95	18,2	12		73,67	NA	NA	62,11
16pl-c	5,1	7,77	11	13,07	48,34	NA	NA	78,24
16pl-d	5,22	9,6	12		56,13	NA	NA	36,98
12pl-a	5,04	27,86	15		66,82	NA	NA	72,84
12pl-b	4,94	25,89	15		68,03	NA	NA	98,81
12pl-c	5,01	26,08	15	15,08	66,99	NA	NA	106,88
12pl-d	5	22,93	15		67,65	NA	NA	100,31
3pl-a	5,29	41,8	10		73,61	NA	NA	118,98
3pl-b	5,12	44,8	10		73,79	NA	NA	205,31
3pl-c	4,98	30,2	10	10,42	70,17	NA	NA	128,69
3pl-d	5,22	54,82	10		73,58	NA	NA	143,96
24pl-a	5,35	29,08	10		72,53	NA	NA	131,75
24pl-b	5,06	25,27	10		76,35	NA	NA	115,77
24pl-c	5,39	40,06	10	9,07	76,52	NA	NA	93,99
24pl-d	5,26	39,95	10		75,15	NA	NA	85,73

Annexe 6 : Concentrations en bromoforme retrouvées dans les eaux du golfe en µg/L sur les 6 campagnes de prélèvements d'eau de mer, et carte avec la localisation des points de prélèvements.

	Bromoforme (ug/L)						Moyenne
	Campagne 1	Campagne 2	Campagne 3	Campagne 4	Campagne 5a	Campagne 6	
1c_0m	0	0,004	0,038	0,000	0,000	0,655	0,12
2c_0m	0,257	0,054	0,113	0,122	0,000	0,645	0,20
3p_0m	0,052	0,329	0,091	0,093	0,000	2,205	0,46
4p_0m	0,051	0,104	0,069	0,034	0,808	0,545	0,27
5p_0m	0,452	0,096	0,096	0,164	1,118	2,604	0,75
6p_0m	0,232	0,051	0,100	0,009	0,767	1,454	0,44
7p_0m	0,036	0,128	0,170	0,491	0,942	2,156	0,65
8p_0m	1,852	1,328	0,206	0,026	0,968	1,128	0,92
1c_P	0,000	0,005	0,034	0,000	0,000	0,660	0,12
2c_P	0,529	0,022	0,100	0,133	0,000	1,234	0,34
3p_P	0,084	0,314	0,086	0,000	0,000	2,299	0,46
4p_P	0,145	0,137	0,078	0,000	0,031	0,895	0,21
5p_P	0,737	0,006	0,088	0,042	0,105	0,809	0,30
6p_P	0,329	0,016	0,073	0,007	0,101	0,701	0,20
7p_P	0,300	0,116	0,057	0,000	0,041	0,000	0,09
8p_P	0,645	0,037	0,105	0,061	1,100	4,693	1,11
8x2_0m	0,000	0,511	0,000	1,299	0,000	32,830	5,77
8x2_P	0,000	0,320	0,000	4,366	0,000	0,000	0,78
9x_0m	1,421	9,478	0,090	0,805	2,379	1,582	2,63
9x_P	1,718	1,127	0,090	0,114	2,582	0,000	0,94
				0,148			0,15
10x_0m	1,537	5,543	4,440	4,273	1,081	9,693	4,43
10x_P	2,244	0,891	9,134	0,107	1,248	0,000	2,27
11x_0m	0,286	4,638	0,080	0,361	1,607	7,492	2,41
11x_P	0,392	2,728	0,076	0,349	2,742	11,039	2,89
12x_0m	0,026	0,441	0,122	0,166	0,802	1,297	0,48
12x_P	0,034	5,028	0,113	9,731	1,076	7,702	3,95
13x_0m	0,169	0,129	0,134	0,000		0,112	0,11
13x_P	0,444	0,033	0,059	0,000		0,107	0,13
24x_0m	0,000	0,000	1,511	0,000		0,165	0,34
24x_P	0,000	0,000	1,300	0,000		0,163	0,29
14m_0m	0,086	0,077	0,048	0,000		0,063	0,05
15m_0m	0,181	0,163	0,053	0,000		0,074	0,09
16m_0m	0,061	0,096	0,482	0,000		0,060	0,14
17m_0m	0,120	0,653	0,159	0,022		0,653	0,32
18m_0m	0,037	0,263	0,045	0,000		0,080	0,09
19m_0m	0,017	0,022	0,076	0,000		0,098	0,04
20m_0m	0,071	0,026	0,053	0,000		0,062	0,04
21m_0m	0,009	0,096	0,044	0,000		0,063	0,04
22m_0m	0,000	0,009	0,046	0,000		0,078	0,03
23m_0m	0,021	0,018	0,055	0,000		0,085	0,04
24m_0m	0,548	0,018	0,913	0,000		0,110	0,32
25m_0m	0,000	0,014	1,941	0,138		0,000	0,42
14m_P	0,109	0,013	0,062	0,000		0,065	0,05
15m_P	0,158	0,156	0,075	0,000		0,053	0,09
16m_P	0,158	0,050	0,557	0,000		0,063	0,17
17m_P	0,159	0,628	0,144	0,032		0,000	0,19
18m_P	0,019	0,000	0,056	0,000		0,046	0,02
19m_P	0,062	0,065	0,045	0,000		0,069	0,05
20m_P	0,046	0,015	0,042	0,000		0,061	0,03
21m_P	0,037	0,105	0,047	0,000		0,059	0,05
22m_P	0,023	0,007	0,049	0,000		0,062	0,03
23m_P	0,023	0,015	0,047	0,000		0,052	0,03
24m_P	0,615	0,005	2,029	0,000		0,142	0,56

