

Production d'un échantillon de référence certifié : du prélèvement au dimensionnement des essais de certification

Guillaume Daugey¹, Patrice Soulé¹, Karine Hakim¹, Alison Hewitt¹, Thierry Prunet¹,
Manuel Nicolas², Mireille Barbaste¹

Résumé. Les matériaux de référence, certifiés ou non, sont indispensables pour développer une nouvelle méthode d'analyse, la valider et vérifier la justesse d'une méthode en production. Les matériaux de référence certifiés existants sur le marché pour l'analyse des éléments minéraux dans les végétaux sont rarement totalement adaptés à une problématique : ils peuvent avoir une matrice éloignée de la matrice des échantillons à analyser; souvent, seulement quelques-uns des éléments cibles ont des valeurs certifiées, ils sont disponibles en petites quantités (de 15 g à 60 g) pour des tarifs élevés et il y a un risque fort de ne plus pouvoir s'approvisionner lorsque le producteur de l'échantillon a totalement écoulé son stock. Dans le cadre de son implication dans des projets de suivi à long terme de placettes forestières, l'Unité de Service et de Recherche en Analyses Végétales et Environnementales de l'INRA (USRAVE) a décidé d'élaborer un échantillon de référence certifié d'aiguilles d'épicéa pour l'analyse des éléments majeurs et en traces. Nous présentons ici la conception de cet échantillon, sa préparation ainsi que les précautions prises et enfin l'élaboration des plans d'expérience de certification.

Mots clés : échantillon de référence certifié, analyse chimique, éléments majeurs, éléments en traces, aiguille d'épicéa

Introduction

Les résultats d'analyse chimique utilisés pour répondre à des questions de recherche en agronomie, environnement, écologie doivent être de grande qualité (justesse, fidélité) pour garantir la pertinence de leur interprétation par les chercheurs. Pour assurer la qualité des résultats, les techniciens et ingénieurs des plateaux d'analyse utilisent divers outils : la validation de la méthode d'analyse et le contrôle de la méthode lors de la production des résultats en sont des exemples. Ces deux outils nécessitent de pouvoir se raccorder à des grandeurs connues. Cela est réalisé par l'utilisation de matériaux de référence certifiés (MRC) ou par des matériaux de référence (MR) communément appelés dans nos laboratoires « échantillons de contrôle ». Le guide ISO 34 :2009 définit le MR comme « un matériau suffisamment homogène et stable en ce qui concerne des propriétés spécifiées, qui a été préparé pour être adapté à son utilisation prévue pour un mesurage » et le MRC comme « un matériau de référence caractérisé par une procédure métrologiquement valide pour une ou plusieurs propriétés spécifiées, accompagné d'un certificat fournissant la valeur de la propriété spécifiée, son incertitude associée, et une déclaration de traçabilité métrologique ». Le MRC du fait de son coût élevé n'est souvent utilisé que pour la création et la validation de méthode, le MR étant privilégié pour le contrôle en production. Le MRC est souvent produit par des organismes nationaux ou supra nationaux : par exemple National Institute of Standards and Technology (NIST), Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM), Laboratoire National de métrologie et d'Essais (LNE) qui assurent la certification du matériau par l'utilisation de méthodes primaires d'analyse ou par l'interrogation d'un panel de laboratoires experts. Dans le cas de la détermination de

¹ INRA, US 1118 USRAVE, F-33882 Villenave d'Ornon Cedex, France ; mireille.barbaste@bordeaux.inra.fr

² Office National des Forêts, Département Recherche Développement Innovation, Bd de Constance, 77300 Fontainebleau, France

Guillaume Daugey, Patrice Soulé, Karine Hakim, Alison Hewitt, Thierry Prunet, Manuel Nicolas, Mireille Barbaste

concentration en éléments minéraux dans une matrice complexe, la méthode primaire employée est la méthode par dilution isotopique.

L'Unité de Service et de Recherche en Analyses Végétales et Environnementales de l'INRA (USRAVE) est une Unité de service qui produit des données de concentration en éléments minéraux dans les plantes au service de la recherche. Elle est accréditée par le COFRAC suivant la norme ISO 17025 pour cette activité (la portée d'accréditation est disponible sur www.cofrac.fr). Elle participe à la production de données pour des dispositifs de suivi sur le long terme des écosystèmes : SOERE ACBB, SOERE PRO, RENECOFOR, ICOS. Ces dispositifs s'intéressent aux éléments constitutifs des plantes et essentiels à leur croissance ou toxiques pour la plante, l'homme ou l'animal et contenus dans différents tissus ou organes (tiges, feuilles, grains). Il est indispensable pour ces dispositifs de pouvoir assurer la fiabilité, la traçabilité et la comparabilité des résultats au cours du temps. L'USRAVE utilise donc couramment des MRC et MR. Elle se heurte cependant à plusieurs difficultés. Les MRC et MR combinent rarement les deux propriétés suivantes : une matrice semblable à celle des échantillons inconnus et des valeurs de référence pour la totalité des éléments à analyser ; ce qui demande de combiner pour certaines analyses l'utilisation de plusieurs MR ou MRC. De plus, l'expérience a montré que les MRC, même produits en grande quantité par le NIST ou l'IRMM sont épuisés avant la fin de certains programmes scientifiques de longue durée pouvant s'étaler sur plusieurs décennies (cas du BCR 101 : l'aiguille de pin). L'USRAVE possède deux MR : le V463 qui est un échantillon de maïs plante entière et le V464 qui est un échantillon de feuilles de chêne. Ces matériaux ont été produits par l'Unité et l'expérience a montré que leur coût de revient est bien moins élevé que le coût d'achat des MRC à des organismes. Ces deux matériaux par leur complexité permettent de représenter une grande variété de matrices végétales : grains, feuilles, tiges de céréales et feuilles d'arbres. Mais ils ne couvrent malgré tout pas toutes les matrices. La disparition de l'échantillon BCR 101 a mis en évidence le besoin d'avoir un nouvel échantillon d'aiguilles de résineux. L'expérience nous a montré qu'avoir en interne au laboratoire des MR en grande quantité permettait d'assurer le suivi de projets de long terme. Nous avons donc décidé de le produire à notre propre usage et à destination de la communauté scientifique. De la même façon que les MR déjà présents à l'USRAVE, il sera vendu aux laboratoires qui en feront la demande. La question qui restait en suspend était MR ou MRC ? Il est intéressant d'avoir un MRC, car cela augmente la confiance des manipulateurs et des demandeurs d'analyse dans la fiabilité du résultat, mais sommes-nous légitimes pour le produire ?

Après avoir amené un nombre croissant de laboratoires à intensifier leur démarche qualité pour aller jusqu'à l'accréditation, la tendance actuelle est d'inciter ces laboratoires leaders, dont la compétence est démontrée et suivie en terme de production de résultats d'essai, à produire des échantillons de référence certifiés. En effet l'ISO guide 34 :2009 dans son annexe C donne un tableau de correspondance entre l'ISO/CEI 17025 et le guide ISO 34. Ce tableau montre que les laboratoires accrédités selon la norme ISO/CEI 17025, répondent déjà à la majorité des exigences du guide ISO 34. Le pas à franchir est moins grand pour un laboratoire accrédité selon la norme ISO/CEI 17025 pour obtenir une reconnaissance supplémentaire dans la production des matériaux de référence. L'exercice de production d'un MRC permettra, par un essai en grandeur réelle et prenant en compte la totalité de la démarche jusqu'à la certification, d'identifier les écarts entre la pratique de l'USRAVE et ce qui est attendu. De ce fait, la production du matériau « épicea » a aussi pour objectif d'évaluer la capacité de l'USRAVE à définir des processus, des procédures et à assurer la traçabilité des différentes opérations.

Dans cet article la première étape de création de MRC ainsi que l'élaboration du protocole de certification sont décrits. Un schéma conceptuel de production et de certification d'un MR est proposé (figure3). Cet article ne donne pas les résultats de cette certification qui fera l'objet d'un article collaboratif. Il a pour objectif de donner les grandes étapes de la genèse d'un MR et de l'illustrer par un exemple concret.

Du besoin au matériau prêt à être analysé

Définition du besoin

Le besoin était le suivant : avoir un matériau d'aiguilles de résineux qui pourra être utilisé pour la validation des méthodes et pour le contrôle en production pour les projets de suivi de long terme des écosystèmes. Ce matériau devra avoir des valeurs de référence pour les éléments majeurs C, N, P, K, Ca, Mg, S, Al, Fe, Cu, Zn, Mn (représentant les éléments des programmes ICOS et RENECOFOR) et les éléments en traces As, Pb, Cd, Ni, Cr, Co, Mo (éléments d'intérêt pour le suivi des contaminations des écosystèmes). L'incertitude associée à ces valeurs ne devra pas dépasser 5 %. En termes de quantité il s'agirait de disposer d'un millier de pots contenant environ 60 g chacun de poudre végétale.

Choix de l'essence résineuse candidate

Tout d'abord, l'essence résineuse candidate doit être choisie parmi les essences les plus répandues et portant des enjeux de recherche. D'autre part, le choix doit être guidé par les contraintes pratiques, notamment en termes d'accessibilité : proximité des parcelles à échantillonner avec l'USRAVE, basée dans la région bordelaise. De plus, le prélèvement et la manipulation doivent être aisés et éviter la mise en danger des opérateurs (éviter les tirs au fusil et l'escalade dans les arbres). Pour toutes ces raisons, notre choix s'est porté sur l'épicéa commun. En pratique, cette essence perd facilement ses aiguilles au séchage, ce qui limite le besoin en main d'œuvre pour la collecte à partir de branches fraîches habituellement laissées sur les parterres de coupe. Il a donc été décidé de rechercher un partenariat possible pour pouvoir profiter d'une coupe régulière d'épicéa, en région Limousin, et de préférence dans un peuplement jeune (1^{ère} éclaircie) afin de prélever des branches de petit diamètre (environ 5 cm) et de faible longueur (environ 2m), facilement manipulables et dont les rameaux peuvent être cisailés avec des outils à main.

Définition de la quantité à prélever

La correspondance entre la quantité de branches d'un épicéa et la masse d'aiguilles sèches est difficile à évaluer. Le parti a été pris d'en prélever un maximum dans le temps imparti (une journée) et en fonction des capacités du véhicule choisi. Dans notre cas, un Renault trafic, prêté par le service travaux des Services d'Appui à la Recherche (SDAR), a été sélectionné.

Préparation et réalisation du prélèvement

Le prélèvement a eu lieu en Corrèze sur la commune de Chamberet sur une parcelle gérée par l'Office national des forêts (ONF). L'ONF a pris en charge l'abattage des épicéas, l'ébranchage et le tronçonnage grâce à une abatteuse. La date de prélèvement a été décidée en fonction des contraintes du partenaire. L'équipe de prélèvement de l'USRAVE devait être mobilisable n'importe quel jour sur une plage de jours possibles annoncés par le partenaire. Le déplacement était prévu sur 3 jours (temps de trajet aller et retour, temps de prélèvement). L'heure de retour avait été estimée pour permettre un déchargement immédiat du véhicule. Le prélèvement a eu lieu le 26/02/2013. Le matériel nécessaire au prélèvement comprenait des tenues de travail pour les agents (combinaisons, bottes), des sécateurs automatiques fournis par l'Unité expérimentale viticole afin de limiter les sollicitations musculaires intenses, 12 sacs de 270 L de 230g/m² en polypropylène tissé de type sac à végétaux (référence : 3700146121047 et 3700146120033 Castorama 2013), une bâche 4x8m de 70g/m² (référence 3454975942013 Castorama 2013) qui a servi à « emballer » l'intérieur du véhicule afin de limiter au maximum les contacts entre le matériel végétal et la carrosserie du véhicule source potentielle de contamination.

Les jours précédant le prélèvement il avait neigé. Le jour du prélèvement, le temps était sec. Le sol de la parcelle était recouvert d'une dizaine de centimètres de neige. La neige a limité le contact des branches avec le sol.

Sur la parcelle, les branches mises à terre par l'abatteuse lors de l'ébranchage ont été coupées à l'aide des sécateurs automatiques. Le maximum de bois a été éliminé pour ne garder que les parties des branches comportant le plus grand nombre d'aiguilles. Les coupes réalisées sont décrites sur la **Figure 1**. La neige résiduelle a été ôtée des parties prélevées en les secouant.

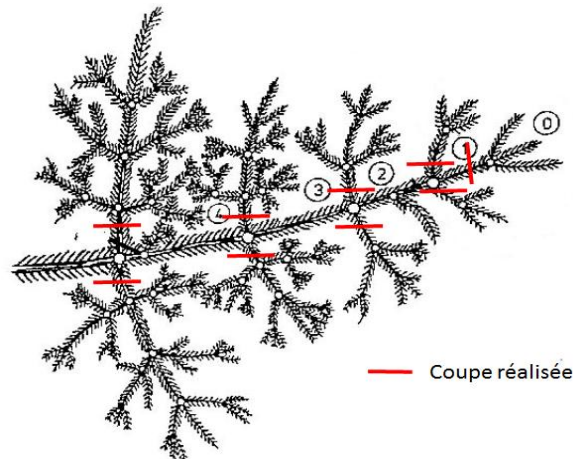


Figure 1. Description du mode de découpe des branches. (Schéma adapté de Rautio et al., 2010).

Evaluation des concentrations

Cette évaluation ne peut pas être utilisée comme une première définition de valeurs de référence. L'assignation d'une valeur de référence ne peut être effectuée qu'une fois que le matériau est mis sous sa forme finale et que son homogénéité a été prouvée. Cette évaluation permet de savoir si le matériel végétal prélevé a les caractéristiques analytiques attendues et si cela vaut la peine de continuer à engager du temps et de l'argent sur sa production. Dans le **Tableau 1**, les résultats de l'analyse remplissant les conditions de l'accréditation de l'USRAVE sont donnés. Le mode opératoire est décrit par ailleurs (Desalme et al., 2011).

Détermination	Valeur	Unité
Cendres	4,23	%
Humidité	5,59	%
As	0,0283	mg/kg
Cd	0,0258	mg/kg
Ca	4,74	mg/g
Cr	0,128	mg/kg
Co	0,0862	mg/kg
Cu	2,04	µg/g
Fe	47,3	µg/g
Mg	0,809	mg/g
Mn	431	µg/g
Mo	< 0,01	mg/kg
Ni	0,507	mg/kg
P	1,37	mg/g
Pb	0,139	mg/kg
K	5,41	mg/g
Zn	29	µg/g

Tableau 1. Evaluation des niveaux de concentration du matériau final

Il a été possible de mesurer une concentration pour chaque élément à l'exception du Mo. Cet élément est très peu concentré et risque de ne pas pouvoir être certifié in fine. L'information « inférieur à une valeur » pourra néanmoins être donné à titre indicatif. Cet élément étant peu demandé et suivi, le risque de ne pas avoir de valeur ne nous a pas paru être un frein à la poursuite de la production du matériau.

Stockage au laboratoire et traitement

Dès l'arrivée du matériel végétal au laboratoire, le traitement a commencé. Au besoin, les rameaux ont été redécoupés puis transférés dans des sacs en papiers de 100 L (référence 3271639400289 Castorama 2013, fabriqués en Chine et distribués par Gysel SA, Belloy en France, de même type que la photo de la figure 2). Les sacs en papiers contenant le matériel végétal ont été mis à sécher dans des étuves contrôlées métrologiquement à la température de $50^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. Les étuves ne pouvant pas accueillir la totalité du matériel végétal prélevé, les sacs papiers le contenant ont été mis à sécher au fur et à mesure de leur préparation du 27/02/2013 au 09/04/2013. Les sacs en attente de traitement ont été conservés ouverts à l'air libre dans un environnement propre. La conservation de l'intégrité de l'échantillon a été contrôlée quotidiennement à l'œil (pas de pourrissement). Au cours du séchage, les aiguilles se sont naturellement détachées du bois. Le tri a été achevé manuellement, en prélevant le restant d'aiguilles encore solidaire du bois et en retirant les autres petits débris végétaux (lichens, écorces...). Ce travail a été terminé le 12/04/2013. A l'issue de ce traitement, l'échantillon de 120 kg d'aiguilles sèches ainsi préparé a été stocké dans les mêmes sacs en papier que ceux utilisés précédemment, fermés en les repliant sur eux-mêmes et en les scotchant.



Figure 2 . Exemple de sac en papier de 100 L résistant au chauffage à 50°C

L'étape de broyage devait initialement être sous-traitée. Malheureusement, les sous-traitants identifiés n'avaient pas de broyeurs non contaminants adaptés au broyage fin d'aiguilles (poudre de granulométrie inférieure à 0,5 mm). Le broyage a finalement été effectué à l'USRAVE grâce au broyeur SM2000 sur une période de 15 jours du 27/01/2014 au 07/02/2014. A l'issue de ce traitement, le matériau était constitué de 100 kg de poudre d'aiguilles d'épicéa.

Homogénéisation et mise en pot

Le Bureau InterProfessionnel d'Etudes Analytiques (BIPEA) a effectué l'homogénéisation et le conditionnement en 1024 pots de 90 grammes de poudre d'épicéa. Suivant la proposition faite par le BIPEA, « le matériau a été homogénéisé par divisions successives, puis divisé en quatre sous-lots qui ont, à leur tour, été divisés en 256 échantillons pour obtenir ainsi 1024 échantillons nécessaires. Cette opération a été réalisée au moyen d'un carrousel. Ce type de matériel est utilisé régulièrement depuis plusieurs années pour la préparation des circuits du BIPEA. Le principe de la répartition tournante, qui entraîne un remplissage progressif des échantillons, assure l'homogénéité du produit entre chacun des échantillons ». Les pots sont en polyéthylène blancs, opaques avec cape. Chaque pot porte une étiquette donnant le nom du matériau et un numéro individuel d'identification de l'échantillon. Le BIPEA assure la traçabilité de chaque pot. Les échantillons ont été réceptionnés le 15/05/2014.

Inertage thermique

Les pots contenant le matériau ont été placés à -26°C du 19/09/2014 au 08/10/2014 afin de tuer les moisissures, insectes et larves d'insectes qui auraient survécu aux étapes de préparation précédentes.

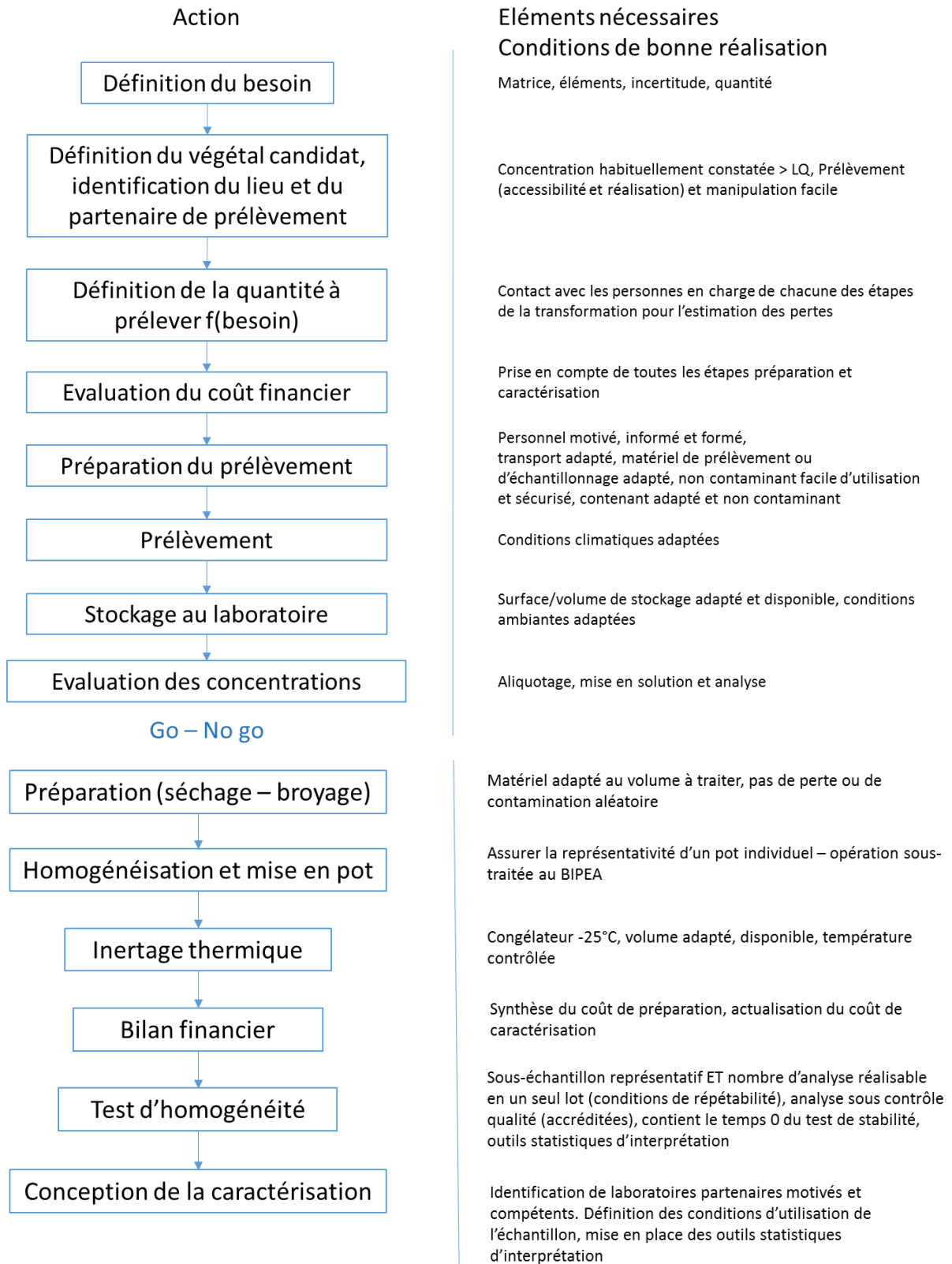


Figure 3 . Schéma conceptuel de production et de certification d'un MR.

Bilan financier

L'ensemble des étapes décrites a coûté 7386,01€ HT (voir **Figure 3**). Ce montant comprend tous les frais engagés par le laboratoire (frais de déplacement, petits matériels et consommables, contrat de main d'œuvre occasionnelle), il ne comprend pas le temps du personnel titulaire.

Mise en place de la certification

L'objet de cet article est de décrire toutes les étapes préalables à la certification proprement dite, y compris les choix fait pour le dimensionnement des analyses à réaliser (nombre d'analyse, de répétitions, de laboratoires participants...). Dans les paragraphes suivants, les auteurs présentent les choix faits pour répondre aux recommandations du guide ISO 35.

Etude d'homogénéité

La certification commence par une étude d'homogénéité inter et intra pots. Le guide ISO 35 recommande de prélever 10 à 30 échantillons quelle que soit la taille du lot de matériau d'origine et préconise trois répétitions par échantillon sachant que l'ensemble des analyses (inter-pots et intra-pot) doit être réalisé en condition de répétabilité de façon à limiter l'impact de la méthode d'analyse. Les séries d'analyse à l'USRAVE comportent idéalement 60 échantillons inconnus plus six échantillons de contrôle. Aussi, nous avons choisi de faire un échantillonnage de 20 pots (soit 60 échantillons ÷ 3 répétitions = 20 pots). Le guide conseille également sur le type d'échantillonnage à réaliser : systématique, aléatoire ou aléatoire stratifié. Etant donné que le matériau a été produit comme un unique lot, nous pourrions choisir un échantillonnage systématique. Cependant, peut-être existe-t-il dans notre mode de préparation un biais que nous n'avons pas identifié aussi, par précaution, nous avons choisi de faire un échantillonnage aléatoire. Enfin, le guide recommande de ne pas passer les 3 répétitions d'un même échantillon dans le même ordre dans chacun des 3 sous-séries de 20 échantillons mais plutôt de les analyser dans un ordre aléatoire. Nous appliquerons cette recommandation afin de nous affranchir d'un éventuel effet de la position de l'échantillon dans la série d'analyse.

Etude de stabilité

Le matériau épicea doit pouvoir être stocké à température ambiante. En effet, 1024 pots représentent un volume conséquent qu'il n'est pas possible de stocker dans une étuve à 20 degrés pendant la totalité de sa durée de vie qui est estimée à plusieurs décennies. Le matériau ne devrait pas être exposé à des températures extrêmes même en cas de transport. Nous avons par conséquent choisi de faire l'étude de stabilité en condition réelle de stockage au laboratoire, c'est-à-dire à température ambiante. Pendant toute la durée de l'essai de stabilité, la température dans le local de stockage sera enregistrée. Nous prévoyons une étude de stabilité sur 4 ans dans des conditions similaires à celles décrites dans l'annexe B du guide : une répétition par an. Une fois que l'échantillon sera utilisé de façon courante dans le laboratoire comme contrôle dans les séries d'analyse, nous serons en mesure de contrôler la stabilité sur le plus long terme.

Caractérisation

La caractérisation comprend l'assignation des valeurs de référence et l'évaluation de l'incertitude. Elle est réalisée par l'analyse de l'échantillon par des laboratoires différents. Idéalement les analyses doivent être conduites selon trois méthodes différentes et par six laboratoires. Chaque laboratoire participant à la caractérisation doit être en mesure de prouver la validité de ses méthodes d'analyse et d'assurer la traçabilité des résultats. L'USRAVE est animateur du réseau des laboratoires publics de référence pour l'analyse des contaminants de l'alimentation et l'environnement : Réseau Public Contaminants. Les laboratoires participant à ce réseau sont tous accrédités par le COFRAC selon la norme ISO/CEI 17025 ou certifiés selon la norme NF EN ISO 9001 et remplissent ces conditions. La caractérisation sera réalisée dans le cadre du Réseau Public Contaminants. Chaque laboratoire recevra deux pots et devra réaliser six répétitions en conditions de fidélité intermédiaire pour chaque pot.

Conclusion

Bien que très complète les guides ISO donnent peu d'informations sur la préparation des MR. L'expérience que nous avons acquise avec la préparation du MR « épicéa » nous a permis d'identifier les grandes étapes de la préparation, les conditions de bonne réussite et les contrôles à mettre en place (go – no go). Le schéma donné dans cet article, illustré par l'exemple du MR « épicéa » peut être réemployé pour la production d'autres MR. La certification du MR « épicéa » devrait se dérouler courant 2015 et le MRC disponible en 2016.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier à l'ONF : Claire Godel, responsable de l'Unité Territoriale Ouest Limousin, et Damien Nicolas, responsable de coupe, qui ont rendu possible le prélèvement des branches d'épicéa sur le terrain. Ce travail n'a été possible que par l'implication de nombreux acteurs : à l'ONF et à l'INRA (unité expérimentales viticole, SDAR). Nous les remercions vivement.

Références bibliographiques

Desalme S, Dalix T, Soulé P, Orignac D, Barbaste M (2011) Choix du broyeur en vue de l'analyse d'éléments en traces dans les plantes. *Cahier des Techniques de l'INRA* **72** : 19-30.

FD ISO GUIDE 35 :2006 (novembre 2006) Matériaux de référence – Principes généraux et statistiques en vue de la certification.

FD ISO GUIDE 34 :2010 (mai 2010) Exigences générales pour la compétence des producteurs de matériaux de référence.

NF EN ISO/CEI 17025 :2005 (septembre 2005) Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais.

Rautio P, Fürst A, Stefan K, Raitio H, Bartels U (2010) *Sampling and Analysis of Needles and Leaves. Manual Part XII. In: Manual on methods and criteria for harmonized sampling, assessment, monitoring and analysis of the effects of air pollution on forests.* UNECE, ICP Forests Programme Co-ordinating Centre, Hamburg, 19p. ISBN: 978-3-926301-03-1. [<http://www.icpforests>].