



**HAL**  
open science

## Développement de l'analyse dirigée par les effets pour identifier les polluants de sols industriels

Maximilien Delafoulhouze, Marie-Hélène Devier, Selim Ait-Aissa, Hélène Budzinski

► **To cite this version:**

Maximilien Delafoulhouze, Marie-Hélène Devier, Selim Ait-Aissa, Hélène Budzinski. Développement de l'analyse dirigée par les effets pour identifier les polluants de sols industriels. 3. Rencontres nationales de la recherche sur les sites et sols pollués, Nov 2014, Paris, France. ineris-01862488

**HAL Id: ineris-01862488**

**<https://ineris.hal.science/ineris-01862488>**

Submitted on 27 Aug 2018

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

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

# Développement de l'analyse dirigée par les effets pour identifier les polluants de sols industriels

Maximilien DELAFOULHOUZE<sup>1</sup>, Marie-Hélène DEVIER<sup>1</sup>, Sélim AIT-AISSA<sup>2</sup> et Hélène BUDZINSKI<sup>1</sup>

- (1) LPTC 351 Cours de la Libération, 33 405 Talence Cedex, France. [M.delafoulhouze@epoc.u-bordeaux1.fr](mailto:M.delafoulhouze@epoc.u-bordeaux1.fr); [mh.devier@epoc.u-bordeaux1.fr](mailto:mh.devier@epoc.u-bordeaux1.fr); [h.budzinshi@epoc.u-bordeaux1.fr](mailto:h.budzinshi@epoc.u-bordeaux1.fr).  
(2) INERIS Parc technologique ALATA, 60 550 Verneuil-en-Halatte, France. [Selim.AIT-AISSA@ineris.fr](mailto:Selim.AIT-AISSA@ineris.fr).

## Résumé

Grâce à des tests biologiques effectués sur un site contaminé à la créosote, une cartographie de la contamination du site a pu être mise en place. Cependant, bien que ce type d'étude permette de localiser les spots de pollution ainsi que le niveau d'impact sur le vivant, il ne fournit aucune information en ce qui concerne la nature des molécules responsables des effets délétères observés lors des biotests. Afin d'identifier les contaminants organiques présents et à l'origine d'activités biologiques, une démarche liant un fractionnement chimique ainsi que des analyses biologiques et chimiques est en cours de développement. Vingt sols ont été testés pour leur activité EROD et deux d'entre eux ont subi une extraction séquentielle afin de vérifier qu'une séparation des contaminants est possible par l'extraction afin d'en simplifier l'identification. Les résultats montrent qu'une activité EROD est associée aux sols en relation avec la présence de molécules de type HAP. Ce test permet aussi de discriminer les sols les plus contaminés en ce type de molécules. Les 16 HAP de l'US-EPA sont responsables de moins de 10% de l'activité observée selon le modèle de toxicité additive. Enfin l'extraction séquentielle permet une séparation des contaminants et montre aussi que l'induction de l'activité EROD est conforme au modèle additif.

## Introduction

La créosote est un mélange complexe utilisé comme biocide et produit hydrofuge dans la protection des bois extérieurs tels les travers de chemin de fer, les poteaux téléphoniques et les piliers de quai. Bien que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) représentent 80% des composés de la créosote, cette dernière contient plus de 10 000 molécules. Les molécules les plus représentées sont le phénanthrène (21%), le fluoranthène (10%), le fluorène (10%), l'acénaphène (9%), le pyrène (8,5%), le dibenzofurane (5%), le naphthalène (composé parent et méthylés : 5%) le chrysène et le carbazole [1]. La créosote est reconnue comme cancérigène présumé pour l'Homme selon l'union européenne (Directive européenne 2011/71/UE) et ce mélange ainsi que ses composants ont également montré leurs effets toxiques sur l'environnement dans plusieurs études [2, 3, 4].

La contamination des sols industriels par ce mélange complexe est donc à l'origine d'une toxicité pouvant nuire à la santé humaine et environnementale. Cependant bien que la créosote soit composée à 80% de HAP, ces derniers ne sont pas nécessairement responsables de la majorité des effets toxiques observés. En effet, Harnik et son équipe ont montré que des eaux souterraines situées sous un site contaminé par de la créosote présentent une toxicité due aux HAP substitués, aux phénols, benzènes et aux hétérocycles azoté (quinoléines), remettant ainsi en cause une évaluation du risque environnemental basée seulement sur la teneur en HAP [5].

C'est pourquoi, il est intéressant de développer des méthodes afin d'identifier les molécules ayant un impact biologique sur les sols industriels sans ciblage de molécules spécifiques. L'une des méthodes utilisées est l'analyse dirigée par les effets (EDA), méthode développée dans les années 80. Elle combine chimie analytique, fractionnement physicochimique et bioessais afin d'identifier les molécules à activité biologique présentes dans les matrices à contamination complexe [6]. Cet article présente le développement de cette méthode appliquée à des sols issus d'un site industriel de créosotage de traverses de chemin de fer contaminées par ce mélange complexe.

## Matériel et méthodes

Description du site et échantillonnage : Le site d'étude est un site de créosotage de traverses de chemin de fer encore en activité situé dans le sud de la France. 20 sols ont été prélevés à différents points du site pour effectuer des tests de microtox, des tests de mortalité et d'évitement de ver de terre, de biomasse végétale fraîche après 14 jours d'exposition et de croissance des tiges et racines après 5 jours d'exposition. Grâce à ces biotests, une hiérarchisation de l'impact écotoxicologique a été déterminée pour chaque sol avec quatre niveaux d'effet (impact certain, impact probable, impact peu probable, aucun impact). Ces vingt sols ont été récupérés afin d'effectuer des analyses HAP et testés pour leur activité EROD. Deux sols nommés P8 et P9 ont également subi une extraction séquentielle afin de tester un fractionnement dès les premières étapes de traitement des échantillons.

Extraction et fractionnement : Afin de pouvoir comparer les réponses biologiques des vingt sols, une extraction accélérée par solvant a été réalisée grâce à un mélange de solvant MeOH : DCM (v : v, 50 : 50) sur les sols selon la méthode décrite par Creusot (2011) [7] et reconnue pour extraire une large gamme de contaminants. Une extraction séquentielle a également été réalisée sur les sols P8 et P9 en extrayant successivement les contaminants grâce à des solvants ou mélanges de solvants de différentes polarités afin de tester le fractionnement des échantillons directement lors de l'extraction. Les extractions appliquées ont été les suivantes : Eau, Eau : MeOH (v : v, 50 : 50), MeOH, MeOH : DCM (v : v, 50 : 50) et DCM. Afin de vérifier l'additivité des effets, les 26 regroupements possibles ont été effectués entre les 5 extractions séquentielles et testés biologiquement afin de les comparer à l'activité théorique correspondante.

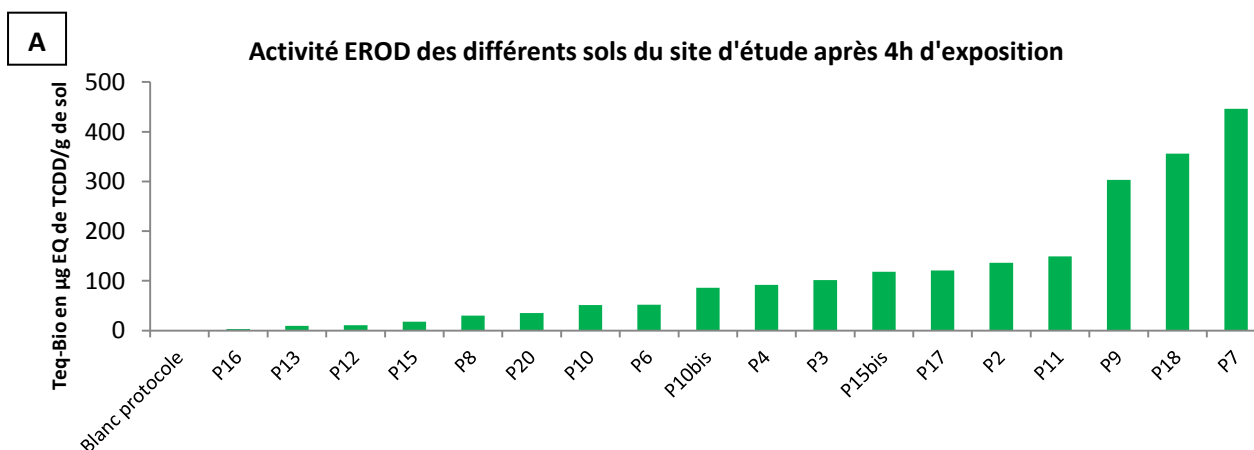
Test d'activité biologique : Les extraits ont ensuite été testés pour leur induction de l'activité éthoxyrésorufine-O-Deéthylase (EROD) du cytochrome P450 1a1 sur la lignée cellulaire PLHC-1 issue de *Poeciliopsis Lucida*. Pour cela, chaque extrait a été dissous dans du DMSO, des dilutions successives réalisées et mises en présence des cellules PLHC-1 afin de pouvoir déterminer la concentration de sol efficace entraînant 20% d'activité EROD (EC20) par rapport au maximum d'activité d'une molécule de référence (la 2,3,7,8-TCDD). De même, les 26 regroupements possibles des 5 fractions des sols P8 et P9 obtenues par l'extraction séquentielle ont été testés pour comparer leur activité par rapport à l'activité théorique correspondantes déterminées grâce à la somme des fractions impliquées lors de chaque regroupement. L'activité enzymatique a été mesurée après des temps d'exposition de 4h et de 24h. De même, la TCDD a été testée afin de vérifier que la réponse cellulaire est correcte et pour déterminer l'équivalent toxique biologique (TEQ-Bio) des différents extraits grâce au rapport de l'EC20 de la 2,3,7,8-TCDD sur l'EC20 de l'extrait étudié.

Analyse chimique et estimation de l'activité théorique : Une analyse chimique a également été réalisée pour déterminer les concentrations des 16 HAP de la liste de l'US-EPA contenus dans chaque sol et ainsi déterminer l'équivalent toxique chimique (TEQ-CHIM) des échantillons après 4h d'exposition grâce à l'utilisation des facteurs d'équivalent toxique (TEF) fournis par Louiz et al. (2007) [8] et les concentrations des HAP de chaque sol :

$$Teq - Chim = \sum TEFi \times Ci$$

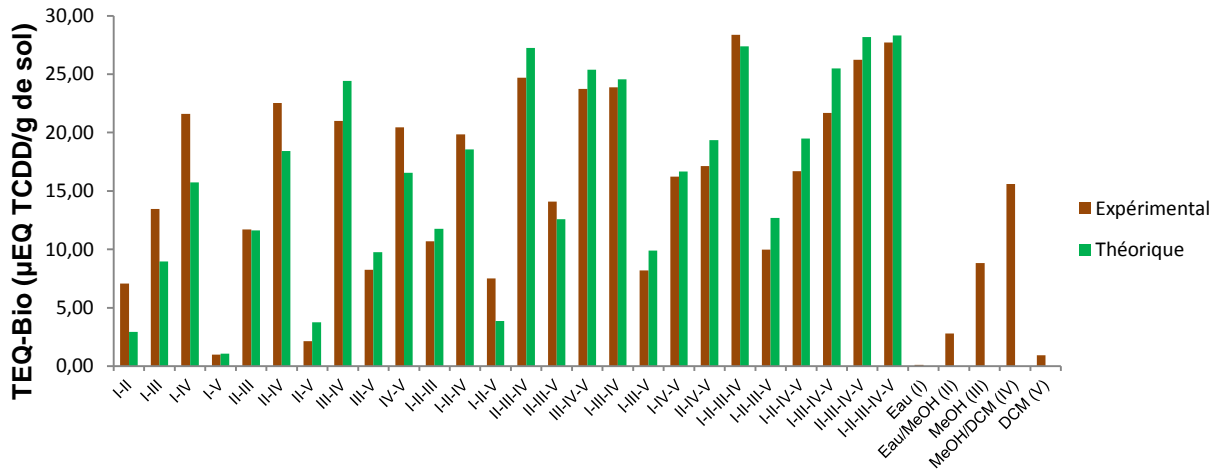
La comparaison TEQ-Bio et TEQ-Chim permet ainsi de savoir quelle est la contribution des 16 HAP de la liste de l'US-EPA à l'activité EROD dans le cas d'une toxicité additive.

## Résultats et discussion



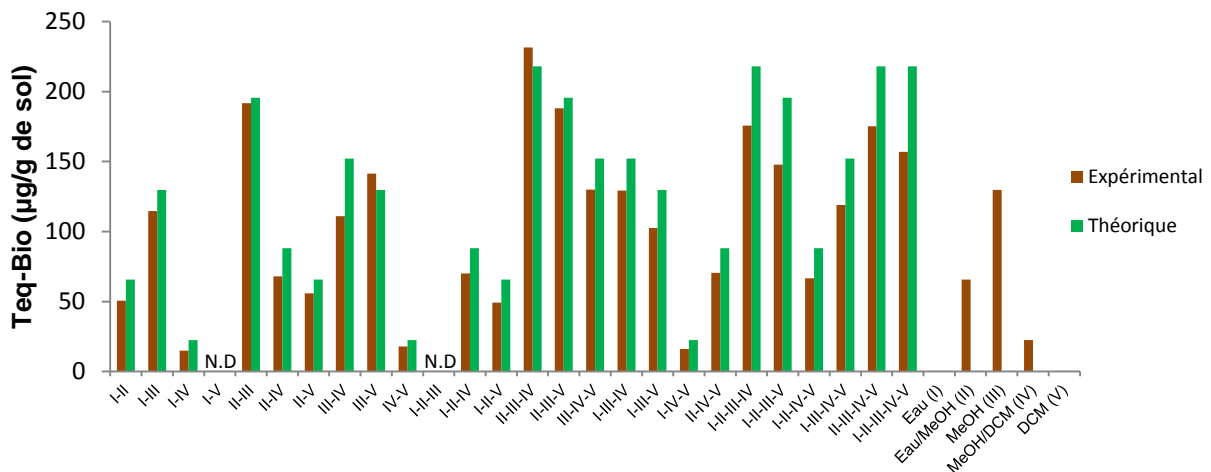
B

### Test d'additivité de l'activité EROD pour le sol P8 après 4h d'exposition



C

### Test d'additivité de l'activité EROD pour le sol P9 après 4h d'exposition



**Figure 1 :** Activité EROD exprimée en  $\mu\text{gEQ-TCDD/g}$  de sol mesurée sur la lignée PLHC-1. L'activité a été mesurée sur les extractions complètes des 20 sols après une exposition de 4h (A). L'activité EROD (exprimée en  $\mu\text{gEQ-TcDD/g}$  de sol) a aussi été mesurée pour des extractions séquentielles sur les sols P8 et P9 impliquant différents solvants et permettant la formation des 5 fractions suivantes : Eau(I), Eau/MeOH (II), MeOH (III), MeOH/DCM (IV) et DCM (V). Les différentes sommes des activités des fractions ont été calculées (théorique) et comparées à leur activité expérimentales. La mesure a été réalisée après une exposition de 4h pour le sol P8 (B) et le sol P9 (C) ; N.D : Non déterminé

Les analyses de l'activité EROD les 20 sols après une exposition des cellules PLHC-1 montrent qu'ils contiennent des molécules induisant une réponse. Une comparaison relative permet de constater que les sols P7, P18 et P9 sont plus contaminés en molécules à activité EROD que l'ensemble des autres sols (figure 1A), ce qui est cohérent avec les biotests de toxicité ayant permis de cartographier des zones de contamination du site. Les analyses EROD effectuées à 24h (non représentées ici), montrent une activité très faible comparée à celles de 4h. Ceci signifie que seules des molécules essentiellement métabolisables sont présentes dans les sols contaminés. Leur métabolisation entraîne une diminution de leur quantité, diminuant ainsi la réponse EROD qui leur est imputable. La diminution importante entre les deux expositions montre que les HAP et molécules apparentées sont majoritairement responsables de l'activité EROD observée, ce qui est compatible avec une contamination à la créosote, mélange riche en HAP. Cependant les 16 HAP de la liste US-EPA sont responsables de moins de 10% de l'activité observée (voir tableau 1) laissant supposé que d'autres molécules présentes dans la créosote sont à l'origine du reste de l'activité. Ces résultats mettent en évidence que les analyses ciblées sur des polluants spécifiques comme les HAP de la liste US-EPA ne permettent pas de mettre en avant des contaminants pouvant être à l'origine d'effets toxiques dans les sols industriels. En effet, bien que les HAP représentent environ 80% de la masse de la créosote, ils expliquent dans les sols moins de 10% de l'activité EROD observée. Ainsi 90% de l'activité est due à des molécules inconnues qui sont minoritaires dans ce type de mélange. Ces contaminants inconnus

possèdent donc une activité EROD bien supérieure à celles des HAP classiques et donc, potentiellement une toxicité supérieure à ces derniers.

**Tableau 1** : Comparaison entre les Teq-Bio et Teq-chim des sols pour l'activité EROD après 4h d'exposition

Sols	TEQ-Chim ( $\mu\text{g EQ TCDD/g de sol}$ )	TEQ-Bio ( $\mu\text{g EQ TCDD/g de sol}$ )	Pourcentage expliqué (en %)
P16	0,2	2,8	6,5
P13	0,7	9,5	7,0
P12	0,3	10,4	2,5
P15	0,4	17,9	2,5
P8	0,9	29,9	2,9
P20	1,1	35,3	3,1
P10	1,2	51,5	2,4
P6	0,7	51,8	1,3
P10bis	3,1	86,4	3,6
P4	3,0	92,0	3,3
P3	8,2	101,4	8,1
P15bis	2,5	118,6	2,1
P17	2,0	120,6	1,6
P2	2,8	136,2	2,0
P11	6,9	149,3	4,6
P9	9,9	303,4	3,2
P18	34,7	356,2	9,7
P7	11,3	446,1	2,5
Blanc protocole	0,0	0,0	100,0

L'extraction séquentielle réalisée sur les sols P8 et P9 montrent qu'un fractionnement est possible grâce à ce type d'extraction (figure 1B et 1C). Seules les fractions les plus apolaires présentent une activité impliquant que les contaminants induisant la réponse EROD sont peu polaires. L'ensemble des regroupements des différentes fractions ont une activité EROD similaire à l'activité théorique associée des différentes extractions séquentielles. Ces résultats mettent en évidence que le modèle de toxicité additive est respecté pour cette activité biologique.

### Conclusion et perspective

Les tests biologiques permettent de discriminer les sols en fonction de leurs niveaux de contamination et mettent clairement en évidence la présence de contaminants de type dioxin-like dans les sols du site étudié. La méthode de fractionnement permet une séparation des contaminants montrant ainsi son intérêt dans une approche EDA et l'étude de contamination complexe en séparant les contaminants en fonction de leurs propriétés physicochimiques (ici, la polarité). L'expérience d'additivité sur les sols P8 et P9 montrent que les mélanges complexes en contaminants présentent des effets additif. Le fractionnement doit maintenant être appliqué sur les autres sols et une analyse chimique des fractions positives effectuée afin d'identifier les molécules responsables de l'activité observée.

Le développement d'une approche EDA sur les sols industriels pollués pourrait servir de diagnostic pour identifier les polluants présents permettant ainsi d'adapter les traitements de dépollution mais aussi d'effectuer des suivis post-traitement. Il serait ainsi possible de savoir si ces derniers sont efficaces et ne sont pas à l'origine de produits de dégradation potentiellement plus toxiques que les molécules mères. Enfin cette approche permettrait de trouver de nouvelles molécules pertinentes à doser dans sols industriels pollués.

## Références

- [1] Sundström, G., Larsson, L. and Tarkpea, M. (1986) Creosote. In: Hutzinger, O. (Ed.), *Anthropogenic Compounds*. Springer Verlag, Berlin :, Heidelberg., Pages 159–205.
- [2] Sved, D W., Roberts, M H. and Van Veld, P A. (1997) Toxicity of sediments contaminated with fractions of creosote. *Water Reseach.*, Volume 31., Issue 2., Pages 294-300.
- [3] Vines, C A., Robbins, T., Griffin, F J. and Cherr, G N. (2000) The effects of diffusible creosote-derived compounds on development in Pacific herring (*Clupeapallasi*). *Aquatic Toxicology.*, Volume 51., Issue 2., Pages 225-239.
- [4] Wu, S., Wu, E., Qiu, L., Zhong, W. and Chen, J. (2011) Effect of phenanthrene on the mortality, growth, and anti-oxidant system of earthworms (*Eiseniafetida*) under laboratory conditions. *Chemosphere*, Volume 83, Pages 429-434.
- [5] Hartnik, T., Norli, H .R., Eggen, T. and Breedveld, G.D. (2007) Bioassay-directed identification of toxic organic compounds in creosote-contaminated groundwater. *Chemosphere.*, Volume 66., Pages 435-443.
- [6] Brack, W. (2003) Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures? *Analytical and Bioanalytical Chemistry.*, Volume 377., Pages 397–407.
- [7] Creusot, N. (2011) Contribution de l'approche effect directed analysis à l'identification de perturbateurs endocriniens dans les milieux aquatiques. (Thèse)
- [8] Louiz, I., Kinani, S., Gouze, M-E., Ben-Attia, M., Menif, D.D, Bouchonnet, S.S, Porcher, J.M., Ben-Hassine, O.K. and Aït-Aïssa, S. (2007) Monitoring of dioxin-like, estrogenic and anti-androgenic activities in sediments of the Bizerta lagoon (Tunisia) by means of in vitro cell-based bioassays : Contribution of low concentrations of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs). *Science of the total environment*, Volume 402., Pages 318 – 329

## Remerciements

La Fondation Innovasol, le CPER A2E, le FEDER et à la Région Aquitaine sont remerciés pour leur soutien financier.