



**HAL**  
open science

# Développement et application de l'analyse dirigée par l'effet pour la recherche et l'identification de contaminants à risque présents dans les sols des sites pollués

Maximilien Delafoulhouze

## ► To cite this version:

Maximilien Delafoulhouze. Développement et application de l'analyse dirigée par l'effet pour la recherche et l'identification de contaminants à risque présents dans les sols des sites pollués. Chimie analytique. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT : 2016BORD0384 . tel-01480150

**HAL Id: tel-01480150**

**<https://theses.hal.science/tel-01480150>**

Submitted on 1 Mar 2017

**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.

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
**DOCTEUR DE**  
**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES  
CHIMIE ANALYTIQUE ET ENVIRONNEMENTALE

Par Maximilien DELAFOULHOUZE

**Développement et application de l'analyse dirigée par  
l'effet pour la recherche et l'identification de contaminants  
à risque présents dans les sols des sites pollués**

Sous la direction de : Dr Hélène BUDZINSKI  
(Encadrante scientifique : Dr Marie-Hélène DEVIER)

Soutenue le 13 Décembre 2016

Membres du jury :

M. ATTEIA, Olivier  
M. MOUGIN, Christian  
M. FAURE, Pierre  
M. AÏT-AÏSSA, Sélim  
M. ATTEIA, Olivier

Professeur, ENSEGID  
Directeur de recherche, INRA  
Directeur de Recherche, CNRS  
Cadre de recherche, INERIS  
Professeur, ENSEGID

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur

## **Titre : Développement et application de l'analyse dirigée par l'effet pour la recherche et l'identification de contaminants à risque présents dans les sols des sites pollués**

**Résumé :** Le sol est une ressource rare remplissant de nombreuses fonctions nécessaires au bon fonctionnement des écosystèmes et de nos sociétés. Malgré tout, il subit des pressions anthropiques à l'origine de sa détérioration. Ainsi en Europe, 16% du territoire est sujet à des dégradations des sols. Une des menaces affectant l'homeostasie des sols est la contamination chimique issue des sites à activités industrielles. Ces sites contaminés, estimés au nombre 2,5 millions en Europe sont à l'origine d'un risque pour la santé humaine et environnementale. Malheureusement, à l'heure actuelle, il n'existe pas de cadre réglementaire européen commun concernant la gestion de ces sites, dont les diagnostics sont réalisés uniquement sur des listes restreintes de molécules et les polluants prioritaires. Cependant, la contamination des sols est généralement issue de mélanges complexes dont la toxicité est due à un ensemble de contaminants. L'objectif de cette thèse concerne l'identification de composés à l'origine de la toxicité des sols pollués en appliquant une analyse dirigée par l'effet (EDA), une technique qui combine des analyses biologiques et chimiques à un fractionnement physico-chimique. Après le développement de l'EDA pour les matrices solides, cette approche a été utilisée sur site afin d'identifier des composés liant le récepteur des hydrocarbures aromatiques (AhR). Ceci a permis de mettre au jour des contaminants à activité biologique non pris en compte dans les diagnostics des sols pollués tels que des hydrocarbures aromatiques polycycliques non prioritaires selon l'US-EPA, leurs produits d'oxydation ainsi que des composés contenant des N-,S-,O-Heterocycles.

**Mots clés :** EDA, sols pollués, Composés aromatiques polycycliques (CAP), Récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR).

---

## **Title : Development and application of the effect-directed analysis for research and identification of risk contaminants in soils of polluted sites**

**Abstract :** The soil is a scarce resource fulfilling many functions necessary for the proper functioning of ecosystems and societies. Nevertheless, it suffers human pressures causing its deterioration. In Europe, 16% of the territory is subject to soil degradations. One of the threats to the soil homeostasis is the chemical contamination from industrial activity sites. These contaminated sites, estimated to number of 2.5 million in Europe are causing a risk to human and environmental health. Unfortunately, at present there is no common European regulatory framework for the management of these sites, whose diagnoses are made only on short lists of molecules and priority pollutants. However, soil contamination generally comes from complex mixtures whose toxicity is due to a combination of contaminants. The aim of this work concerns the identification of compounds responsible for the toxicity of the contaminated soil by applying an effect-directed analysis (EDA), a technique which combines biological and chemical analyzes to a physico-chemical fractionation. After the development of EDA on the solid matrices, this approach has been used on polluted sites to identify the compounds binding to the aryl hydrocarbon receptor (AhR). This allowed to highlight contaminants with a biological activity not included in the diagnoses of polluted soils such as polycyclic aromatic hydrocarbons non-priority according to US-EPA, their oxidation products and compounds containing N -, S-, O-heterocycles.

**Keywords :** EDA, polluted soils, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAC), aryl hydrocarbon receptor (AhR).

---

**Environnement et Paléoenvironnement Océaniques et Continentaux (EPOC)  
Equipe de Physico- et Toxicochimie de l'environnement (LPTC)**

UMR CNRS 5805 EPOC, Université de Bordeaux  
Batiment A12, 2<sup>ème</sup> étage Ouest  
351 Cours de la Libération  
33405 Talence, France

**Fondation INNOVASOL associant l'université Bordeaux Montaigne, la région  
Aquitaine, EDF, GDF-SUEZ, TOTAL et la SNCF comme fondateurs**

Fondation Partenariale Innovasol  
1 allée F.Daguin  
33607 Pessac Cedex France

# Remerciements

---

Tout d'abord, merci aux membres du jury d'avoir jugé ce travail et pour leur remarques constructives. Merci à M Pierre Faure, directeur de recherche au sein du LIEC à Nancy et à M Christian Mougin, directeur de recherche à l'INRA de Versailles qui m'ont fait l'honneur d'évaluer ce travail en tant que rapporteurs. Merci également à M. Sélim Aït-Aïssa, cadre de recherche à l'INERIS à Verneuil-en-Halatte et à M Olivier Atteia, professeur à l'ENSEGID à Bordeaux pour avoir été examinateurs lors de ma soutenance de thèse.

Merci à la fondation Innovasol et à ses membres fondateurs de m'avoir fait confiance dans la réalisation de ce travail. Je tiens plus particulièrement à remercier M Olivier Atteia, responsable scientifique qui a su me conseiller et M Jean-Louis Crabos en tant que directeur du programme.

Merci à l'INERIS pour leur collaboration et pour m'avoir accueilli lors de ces travaux au sein de l'unité ECOT à Verneuil-en-Halatte. Merci à M Sélim Aït-Aïssa pour son expertise scientifique en culture cellulaire et à Mme Emmanuelle Maillot-Marechal ainsi qu'à Nicolas Creusot pour leur bonne humeur, leurs conseils et la bonne ambiance de travail lors de mes expériences biologiques.

Je tiens à remercier le laboratoire EPOC et plus particulièrement l'équipe LPTC pour leur accueil au sein de leurs locaux et pour m'avoir permis de travailler avec du matériel de pointe en chimie analytique. Je tiens plus particulièrement à remercier Hélène Budzinski pour l'encadrement de ces travaux ainsi que son expertise scientifique et Marie-Hélène Devier pour ses conseils avisés.

Merci à Karyn Le Menach avec qui j'ai longuement travaillé pour réaliser les analyses chimiques par chromatographie en phase gazeuse et qui a su résoudre de nombreux problèmes lors de mes analyses

Merci à Caroline Gardia-Parège pour son amitié mais également pour m'avoir formé à la préparation des échantillons lors de l'analyse dirigée par l'effet. Merci également pour les bons moments que nous avons passé ensemble que ce soit au LPTC ou à l'INERIS.

Merci à Laura FUSTER ([fystær]) pour son amitié et pour l'ensemble du travail que nous avons réalisé ensemble en culture cellulaire.

Merci à l'ensemble de l'équipe permanente du LPTC. Je pense à Laurent avec qui j'ai beaucoup appris sur l'ASE, à Sylvie avec qui j'ai partagé la responsabilité de certaines salles, à Pierre pour les discussions que nous avons eu et le combattant acharné dans la fermeture de nos sessions internet ainsi qu'à Manou et Patrick pour les conversations du midi au Haut-Carré. Merci aussi à Edith pour les nombreuses questions que je lui ai posées sur la matière

organique et à Nathalie Geneste pour la tentative d'étude de docking des composés actifs retrouvés dans cette thèse.

Merci à l'ensemble de mes collègues de bureau qui ont su garder des nerfs d'acier en ma présence. Merci pour cela à Caroline, Laura, Yann, Mathilde (qui a su souffrir en silence) et Hugues Bijoux.

Merci à l'ensemble des thésards du laboratoire que j'ai eu l'occasion de côtoyer durant ces travaux et avec qui j'ai, bien entendu, beaucoup échangé scientifiquement mais également créé des liens d'amitié. Merci pour ce fait à Rami, Coralie, Yann, Justine, Hugues, Hôï, Nathalie (que j'adore), Caroline (Les deux), Gabriel (et les parties de tennis), Théo, Mathilde, Laura, Vincent, Jérémie et Laurine.

Merci à Baptiste, Mohamed, Caroline Martin, Thomas Geny, Thomas Corrales, Lucas, Jérémy, Laura Mouret, Pierre Van Delft, Céline et Maylis pour leur amitié et les bons moments passés ensemble.

Merci à mes amis de longue date. Merci au quatuor magic composé de Yohan, Adrien et Cédric qui sont comme des frères pour moi. Merci également à Nicolas même s'il avait oublié ma date de soutenance.

Merci à ma famille et plus particulièrement à ma mère, mon père et ma sœur pour leur soutien indéfectible.

Merci à tous ceux que j'aurais pu oublier ici. Sachez que je pense à vous tout de même.

Et merci à toi, mon Amour d'être là tout simplement.

# SOMMAIRE

<b>GLOSSAIRE</b> .....	<b>10</b>
<b>TABLE DES FIGURES</b> .....	<b>13</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX</b> .....	<b>15</b>
<b>PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS</b> .....	<b>17</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	<b>18</b>
<b>I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>21</b>
I. INTRODUCTION .....	22
II. LE SOL ET SON IMPORTANCE.....	22
III. LES MENACES AFFECTANT LES SOLS.....	24
1. <i>La perte de matière organique</i> .....	24
2. <i>L'imperméabilisation des sols</i> .....	26
3. <i>La salinisation</i> .....	26
4. <i>L'érosion des sols et les glissements de terrain</i> .....	26
5. <i>Le compactage du sol</i> .....	26
6. <i>Le changement ou la diminution de biodiversité</i> .....	27
7. <i>La contamination des sols</i> .....	27
IV. CARACTERISTIQUES DES SITES CONTAMINÉS EN EUROPE .....	27
1. <i>Comptabilisation des sites et sols pollués ou potentiellement contaminés en Europe</i> .....	28
2. <i>Les sources de contamination des sites et sols pollués</i> .....	29
3. <i>La gestion et les coûts des sites contaminés ou potentiellement contaminés</i> .....	30
4. <i>Les contaminants issus des sites et sols pollués</i> .....	33
4.1. La contamination inorganique: les métaux lourds.....	33
4.2. La contamination organique.....	34
4.2.1. Les huiles minérales .....	34
4.2.2. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (ou HAP) .....	34
4.2.3. Les hydrocarbures aromatiques (BTEX) .....	36
4.2.4. Les hydrocarbures chlorés .....	36
5. <i>L'évaluation des risques environnementaux des sols contaminés</i> .....	37
5.1. La réglementation.....	37
5.2. Complexité de la contamination chimique.....	41
V. LA BIO-ANALYSE: LIEN ENTRE LES CONTAMINANTS ET LES EFFETS BIOLOGIQUES.....	42
VI. CONCLUSION.....	46
<b>II. METHODOLOGIE</b> .....	<b>48</b>
I. LES SITES D'ETUDE ET L'ECHANTILLONNAGE .....	49

1.	<i>Premier site d'étude : Centrale de traitement de bois par la créosote</i>	49
1.1.	Rappels sur la créosote de goudron de houille	49
1.2.	Informations sur le site d'après la base de données gouvernementale Basol	50
1.3.	Plan du site et échantillonnage	51
2.	<i>Deuxième site d'étude : Usine de traitement de gaz</i>	53
2.1.	Informations sur le site d'après la base de données gouvernementale Basol	53
2.2.	Plan du site et échantillonnage	53
1.	<i>Troisième cas d'étude : Une boue de station d'épuration urbaine, amendement possible pour la réhabilitation des sols industriels pollués ?</i>	56
2.	<i>Caractéristiques de la station d'épuration Louis fargues</i>	57
II.	LA DEMARCHE D'ETUDE D'UN SITE	59
III.	METHODE D'EXTRACTION DES CONTAMINANTS	60
1.	<i>Les différentes méthodes d'extractions appliquées aux matrices solides</i>	61
2.	<i>Choix de l'extraction accélérée par solvant et la méthode employée</i>	64
IV.	LE SCREENING PRELIMINAIRE DES SOLS D'UN SITE POUR CHOISIR LES MEILLEURS CANDIDATS A FRACTIONNER	67
1.	<i>Analyses chimiques</i>	67
1.1.	Analyses ciblées	67
1.1.2.	Analyse des PCB	68
1.1.3.	Analyse des HAP	69
2.	<i>Analyses non ciblées : la notion d'empreinte chromatographique</i>	70
3.	<i>Analyses biologiques</i>	71
3.1.	Les outils in vivo	72
3.2.	Les outils in vitro	73
3.2.1.	<b>Les outils <i>in vitro</i> impliquant les récepteurs nucléaires</b>	73
3.2.2.	<b>Les outils <i>in vitro</i> impliquant les récepteurs nucléaires utilisés dans cette étude : Choix des lignées, entretien et déroulement des bioessais</b>	75
3.3.	Les autres tests in vitro utilisés lors de l'étude	81
3.3.1.	Test de génotoxicité : Le SOS-Chromotest	82
3.3.2.	Les tests de toxicité aigüe : Le microtox et l'inhibition de croissance algale de <i>Pseudokirschnerilla subcapitata</i>	82
4.	<i>Equilibre des masses : Lien entre les analyses chimiques et biologiques</i>	83
V.	FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT DU SOL SELECTIONNE PAR CLHP	85
1.	<i>La méthode en phase inverse (RP-CLHP)</i>	86
2.	<i>La méthode en phase normale</i>	87
3.	<i>Sélection du type de fractionnement en HPLC à appliquer sur les sols étudiées</i>	88
VI.	ANALYSE CHIMIQUES DES FRACTIONS POSITIVES POUR L'IDENTIFICATION DES COMPOSES BIOLOGIQUEMENT ACTIFS	89
1.	<i>Généralités sur la chromatographie et la spectrométrie de masse</i>	89
2.	<i>Les analyses par GC-(Q)/ToF</i>	92



3.	<i>Les analyses par LC-Q/ToF</i> .....	93
VII.	LES APPROCHES POUR CONFIRMER DES MOLECULES IDENTIFIEES POTENTIELLEMENT ACTIVES .....	96
VIII.	LA DEMARCHE QUALITE APPLIQUEE LORS DES EXPERIENCES .....	97
1.	<i>Le processus qualité au cours de l'approche EDA</i> .....	97
2.	<i>Les biotests et leurs témoins</i> .....	97
3.	<i>Suivi qualité des analyses chimiques</i> .....	97
IX.	RESUME DE L'APPROCHE .....	98
<b>III.</b>	<b>RESULTATS</b> .....	<b>100</b>
I.	DEVELOPPEMENTS METHODOLOGIQUES.....	101
I.	<i>Résultats des différents bioessais appliqués au site d'étude contaminé par la créosote</i> .....	102
1.	Choix de la lignée pour l'activité AhR .....	103
1.1.	Résultats.....	103
1.2.	Discussion sur les résultats des tests des lignées cellulaires.....	104
1.3.	Conclusion sur l'activité AhR .....	105
2.	Les tests de toxicité aigue .....	105
2.1.	Inhibition de croissance de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> .....	105
2.2.	Le test sur <i>Vibrio Fischeri</i> : Le Microtox® .....	106
2.3.	Discussion sur les résultats des deux tests de toxicité aiguë .....	106
2.4.	Conclusion sur les tests de toxicité aiguë.....	108
3.	SOS-chromotest : la détection de molécules potentiellement génotoxiques .....	108
3.1.	Résultats.....	108
3.2.	Discussion.....	109
3.3.	Conclusion .....	109
4.	Conclusion sur les biotests et leur compatibilité avec la démarche EDA.....	109
II.	<i>Les tests méthodologiques pour l'approche EDA</i> .....	110
1.	Comparaisons entre un fractionnement en phase normale et en phase inverse.....	110
2.	Vérification de l'additivité des effets sur une extraction séquentielle par ASE .....	113
3.	Conclusion sur les tests d'extraction et de fractionnement .....	116
II.	MISE EN ŒUVRE DE L'EDA : PREMIERE ETAPE, CRIBLAGE DES SOLS EN VUE DE SELECTIONNER LES SOLS A FRACTIONNER.....	117
I.	<i>Criblage des sols du site contaminé par la créosote pour sélectionner le sol le plus pertinent à fractionner et pour une analyse chimique plus poussée</i> .....	118
1.	Dosage des HAP et PCB.....	118
2.	Analyse biologique des sols .....	119
3.	Comparaison des empreintes chromatographiques des sols du site.....	121
4.	Conclusion sur le criblage du site et sélection du sol à fractionner .....	122
II.	<i>Criblage des sols du site de traitement de gaz pour sélectionner le sol le plus pertinent à fractionner et pour une analyse chimique plus poussée</i> .....	123
1.	Les analyses ciblées .....	123

1.1.	Analyse des HAP .....	123
1.2.	Analyse des PCB .....	124
2.	Analyse biologique des sols .....	125
3.	Comparaison des empreintes chromatographiques des sols du site.....	127
4.	Conclusion sur le criblage du site et sélection du sol à fractionner .....	127
III.	<b>MISE EN ŒUVRE DE L'EDA : ÉTAPE 2, APPLICATION DE L'EDA AUX SOLS SELECTIONNES LORS DES CRIBLAGES DES SITES ET A LA BOUE DE STATION D'EPURATION .....</b>	<b>128</b>
1.	Article 1 : Application de l'analyse dirigée par l'effet pour identifier des polluants organiques dans les sols industriels pollués par de la créosote.....	129
2.	Article 2 : Identification de ligands AhR présents dans un sol contaminé d'une usine de traitement de gaz par une approche d'analyse dirigée par l'effet .....	151
3.	<i>Application 3 : Analyse dirigée par l'effet d'une boue de station d'épuration : boue pouvant servir comme amendement sur les sols industriels pollués. ....</i>	<i>171</i>
<u>1.</u>	Activité biologique de l'extrait brut et des différentes fractions .....	171
1.1.	Activité œstrogénique.....	171
1.2.	Activité AhR.....	172
<u>2.</u>	Analyses non ciblées en GC-(Q)/ToF et LC-Q/ToF .....	173
<u>3.</u>	Conclusion de l'utilisation de la démarche sur la boue de station d'épuration .....	174
<u>4.</u>	<i>Conclusion de l'application de l'EDA sur des matrices solides .....</i>	<i>175</i>
	<b>DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>176</b>
I.	<b>L'EDA ET SES DIFFERENTES ETAPES .....</b>	<b>177</b>
1.	<i>L'extraction des composés : Vers une prise en compte de la bioaccessibilité ?.....</i>	<i>177</i>
2.	<i>Le fractionnement.....</i>	<i>179</i>
3.	<i>Les bioessais : Limites et avantages .....</i>	<i>179</i>
4.	<i>L'identification de composés : une analyse complexe .....</i>	<i>180</i>
5.	<i>Confirmation : L'étape limitante de l'analyse dirigée par les effets .....</i>	<i>186</i>
6.	<i>Conclusion sur l'EDA .....</i>	<i>189</i>
II.	<b>DISCUSSION SUR LES COMPOSES ANALYSES ET PERSPECTIVES D'ETUDES SCIENTIFIQUES.....</b>	<b>189</b>
	<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>190</b>
	<b>RÉFÉRENCE.....</b>	<b>192</b>
	<b>ANNEXES.....</b>	<b>212</b>
	ANNEXE 1 : PROFIL DE FRACTIONNEMENT PAR NP-HPLC.....	213
	ANNEXE 2 : COMPOSES TESTES POUR LEUR ACTIVITE AHR.....	214
	ANNEXE 3 : COURBES DOSE-REPNSE DES COMPOSES ACTIFS .....	216
	ANNEXE 4 : PRIX DES COMPOSES .....	225
	ANNEXE 5 : COMPOSES IDENTIFIES ET DOSES PAR GC/MS.....	226

## **Glossaire**

**ACN** : Acétonitrile

**ADME** : Absorption, Distribution, Métabolisation et Excretion

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**AEP** : Alimentation en Eau Potable

**AhR** : Recepteur aux hydrocarbures aromatiques

**AR** : Androgen Receptor

**ASE ou PFE** : Accelerated Solvant Extraction ou Pressured Fluid Extraction

**ATSDR** : Agence for Toxic Substances and Disease Registry

**BaP** : Benzo(a)pyrene

**BTEX** : Benzène, Toluène, Ethyl-benzène et Xylène

**CAR** : Constitutive Androstane Receptor

**CEPA** : Canadian Environmental Protection Act

**CMR** : Cancérogène, Mutagène et Reprotoxique

**COV** : Composés Organiques Volatils

**CS** : Contaminated Site

**DCM** : Dichloromethane

**DCO** : Demande Chimique en Oxygène

**DDT** : Dichlorodiphényltrichloroéthane

**DMSO** : diméthylsulfoxyde

**DRIRE** : Direction Régionale de l'Industrie de la Recherche et de l'Environnement

**E1** : Estrone

**E2** : 17 $\beta$ -Oestradiole

**EC** : Concentration efficace

**ECD** : Electrons Capture Detector

**EDA** : Effect directed-Analysis (ou analyse dirigée par les effets)

**EE** : 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol

**EEA** : European Environment Agency

**EH** : Equivalent Habitant

**ER** : Estrogen Receptor

**EROD** : Ethoxyresorufin-O-deethylase

**ESI** : Electron Spray Ionisation

**ETM** : Élément trace métallique

**ETM** : Element Trace Métallique

**GC** : Gas Chromatography

**GPL** : Gaz de Pétrole Liquéfié

**GR** : Glucocorticoïd Receptor

**HCH** : Hexachlorocyclohexane

**HPLC ou CLHP** : Chromatographie liquide à haute performance

**ICPE** : Installation classées pour la protection de l'environnement

**IRBS** : Indice de Réponse Biologique du Sol

**LC** : Liquid Chromatography

**LQ** : Limite de quantification

**MBA** : Mass Balance Analysis

**MEA** : Millennium Ecosystem Assessment

**MeOH** : Methanol

**MFE** : Feature by Molecular Extraction

**MS** : Mass spectrometry

**MSD** : Mass Selective Detector

**MTT** : Sel de tétrazolium

**NP** : Normal Phase

**OCDE** : Organisation de coopération et de développement économiques

**OCN** : Octachloronaphtalène

**Oxy-HAP** : Forme oxydée des hydrocarbures aromatiques polycycliques

**PAC ou CAP** : Composé Aromatique Polycyclique

**PAH ou HAP** : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

**PCB** : Polychlorobiphényle

**PCDD** : Polychlorodibenzo-p-dioxine

**PCDF** : Polychlorinated dibenzofurane

**PCS** : Potentially Contaminated Site

**PDB** : Protein Data Bank

**PNUE** : Programme des Nations Unies pour l'environnement

**PPAR** : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor

**PR** : Progesterone Receptor

**PXR** : Pregnane X Receptor

**Q** : Quadripôle

**RAR** : Retinoïc Acid Receptor

**REACH** : enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des produits chimiques

**RP** : Reverse Phase

**RXR** : Retinoïd X Receptor

**SIM** : Single Ion Monitoring

**TCDD** : 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzodioxine

**TEF ou REP** : Toxic Equivalent Factor ou Relative potency values

**TEQ** : Toxic equivalent ou équivalent toxique

**TEQ-bio (Bio-TEQ)** : Equivalent toxique biologique

**TEQ-chim (Chem-TEQ)** : Equivalent toxique chimique

**TIC** : Total Ion Chromatogram

**ToF** : Time of Flight

**TR** : Thyroïd hormone Receptor

**TSCA** : Toxic Substances Control Act

**UE** : Union Européenne (EU en anglais)

**US-EPA** : Agence de protection environnementale des Etats-Unis

**VCI** : valeur de constat d'impact.

**WHO ou ONU** : Organisation des nations unies

## Table des Figures

<b>Figure 1</b> : Les différentes étapes de la formation du sol. ....	23
<b>Figure 2</b> : Les différents types de services écosystémiques fournis par le sol .....	24
<b>Figure 3</b> : Les différentes menaces affectant les sols.....	25
<b>Figure 4</b> : La teneur en matière organique des sols européens.....	25
<b>Figure 5</b> : Nombre estimé de sites potentiellement contaminés et contaminés en Europe. ....	28
<b>Figure 6</b> : Secteurs et sources d'activité à l'origine de sites contaminés en Europe. ....	30
<b>Figure 7</b> : Méthodes d'assainissement des sites pollués utilisées en Europe. ....	31
<b>Figure 8</b> : Répartition des coûts moyens pour la gestion d'un site contaminé. ....	31
<b>Figure 9</b> : Origine des financements utilisés pour la gestion des sites contaminés. ....	32
<b>Figure 10</b> : Coût en euros (€) de la gestion des sites contaminés par habitant et par an dans les différents pays européens. ..	32
<b>Figure 11</b> : Les principaux contaminants présents dans le sol (A) et les eaux souterraines (B) des sites contaminés. ....	33
<b>Figure 12</b> : Représentation des 16 HAP prioritaires de la liste US-EPA. ....	35
<b>Figure 13</b> : Représentation des 4 BTEX .....	36
<b>Figure 14</b> : Structures génériques des PCB, des PCDD et des PCDF.....	37
<b>Figure 15</b> : Illustration de l'analyse dirigée par l'effet.....	43
<b>Figure 16</b> : Utilisation de la créosote de goudron de houille .....	50
<b>Figure 17</b> : Plan du site A avec identification des différentes zones d'activités et localisation des points de prélèvement. ....	52
<b>Figure 18</b> : Vu d'ensemble des zones d'échantillonnage du site d'étude B.....	54
<b>Figure 19</b> : Localisation de la station d'épuration Louis Fargues (point bleu) et du point de rejet des eaux usées dans l'environnement (marqueur rouge).....	58
<b>Figure 20</b> : Caractéristiques annuelles de la station d'épuration Louis Fargues (A) et devenir des boues générées par an (B).....	59
<b>Figure 21</b> : Schéma du mode opératoire de l'analyse d'un site d'étude.....	60
<b>Figure 22</b> : Photographie d'un ASE 200 <sup>®</sup> et de son principe de fonctionnement .....	64
<b>Figure 23</b> : Schéma et Tableau explicatifs du protocole expérimental pour l'extraction séquentielle et le test d'additivité des fractions. ....	66
<b>Figure 24</b> : Cadre conceptuel de l'écotoxicologie d'un contaminant chimique .....	72
<b>Figure 25</b> : Principe de l'utilisation d'un gène rapporteur. ....	74
<b>Figure 26</b> : Ligands représentatifs du récepteur Ah.....	76
<b>Figure 27</b> : Voie d'activation du récepteur Ah et de mesure de l'activité EROD.....	76
<b>Figure 28</b> : Schéma d'une plaque lors d'un bioessai impliquant la mesure d'une activité AhR. ....	78
<b>Figure 29</b> : Mécanisme d'action des récepteurs aux œstrogènes .....	80
<b>Figure 30</b> : Représentation des courbes dose-réponse obtenues lors des bioessais pour les extraits ou les composés purs. ....	83
<b>Figure 31</b> : Chaîne HPLC équipée d'un détecteur UV/Visible à barrettes de diodes et d'un collecteur automatique de fractions. ....	86
<b>Figure 32</b> : Exemple de greffons utilisés en phase inverse .....	86
<b>Figure 33</b> : Exemple de greffons utilisés en phase normale.....	87
<b>Figure 34</b> : Spectre de masse de la 1-phényl-2-propanone de masse molaire = 134,18 g/mol.....	91
<b>Figure 35</b> : Présentation des différentes méthodes utilisables en spectrométrie de masse.....	91
<b>Figure 36</b> : GC-Q/ToF.....	92
<b>Figure 37</b> : LC-QTOF.....	93
<b>Figure 38</b> : Illustration d'un graphique obtenu par MassProfiler. ....	95
<b>Figure 39</b> : Procédure lors de l'analyse d'un site avec les prises de décisions à chaque étape. ....	99

<b>Figure 40</b> : Hiérarchisation des sols du site de creosotage (site A), de l'usine à gaz (site B) et d'un troisième site non étudié dans cette thèse (site C) selon les résultats de trois bioessais et l'indice de réponse biologique du sol (IRBS).....	102
<b>Figure 41</b> : Activités AhR obtenues pour les 4 sols étudiés.....	103
<b>Figure 42</b> : Résultats des tests d'inhibition de croissance de l'algue <i>Pseudokirschneriella Subcapitata</i> .....	106
<b>Figure 43</b> : Extinction de la luminescence de <i>Vibrio Fischeri</i> après une exposition des bactéries à différentes concentrations de l'extrait du sol P9.....	106
<b>Figure 44</b> : Représentation des extraits obtenus pour chaque sol et du blanc d'extraction lors des extractions ASE pour l'analyse dirigée par les effets. ....	107
<b>Figure 45</b> : Résultats du SOS-chromotest sur le sol P9. ....	108
<b>Figure 46</b> : Activités AhR et ER des différents blancs réalisés durant l'expérience liées au choix de la méthode de fractionnement. ....	111
<b>Figure 47</b> : Activité AhR de la solution d'activité connue à différentes étapes du fractionnement et après 4h (A) et 24h (B) d'exposition. ....	112
<b>Figure 48</b> : Activité œstrogénique de la solution d'activité connue à différentes étapes du fractionnement après 16h d'exposition. ....	112
<b>Figure 49</b> : Profil chromatographique des fractions Méthanol, Méthanol/Dichlorométhane (v/v ; 50 :50) et Dichlorométhane du sol P8 après une extraction séquentielle .....	113
<b>Figure 50</b> : Résultats de l'expérience d'additivité des effets pour l'activité EROD.....	115
<b>Figure 51</b> : Corrélation entre l'activité EROD théorique et expérimentale des différents regroupements des extractions séquentielles des sols P8 et P9.....	116
<b>Figure 52</b> : Concentration (en µg/g de sol sec) des 20 HAP dosés pour les sols du site contaminé par la créosote.....	118
<b>Figure 53</b> : Activité AhR des différents sols du site de créosotage après 4h d'exposition.....	119
<b>Figure 54</b> : Concentration totale sur les 20 HAP dosés des différents sols de l'usine de traitement de gaz.....	123
<b>Figure 55</b> : Activité AhR des différents sols du site de créosotage après 4h (A) et 24h (B) d'exposition. ....	126
<b>Figure 56</b> : Activité œstrogénique de la boue issue de la station d'épuration Louis Fargue après les différentes étapes de l'analyse dirigée par l'effet ainsi que celle des fractions associées à l'échantillon. ....	171
<b>Figure 57</b> : Activité AhR après 4h d'exposition des cellules PLHC-1.....	172
<b>Figure 58</b> : Superposition des profils chromatographiques de l'ensemble des fractions actives pour l'activité œstrogénique et AhR. ....	174
<b>Figure 59</b> : Diagramme représentant l'évolution de la biodisponibilité des contaminants au cours du temps. ....	178
<b>Figure 60</b> : Représentation de la bioaccessibilité et de la biodisponibilité des contaminants présents dans le sol.....	179
<b>Figure 61</b> : Profil d'activité AhR des fractions du sol P9. ....	181
<b>Figure 62</b> : Superposition des chromatogrammes des fractions 9-12. ....	181
<b>Figure 63</b> : Profil de l'activité AhR des fractions des deux sols étudiés lors de ces travaux. ....	182
<b>Figure 64</b> : Comparaison des chromatogrammes des fractions 7 des deux sols étudiés (P9 et 168).....	183
<b>Figure 65</b> : Comparaison des chromatogrammes des fractions 9 des deux sols étudiés (P9 et 168).....	183
<b>Figure 66</b> : Comparaison des chromatogrammes des fractions 8 des deux sols étudiés (P9 et 168).....	184
<b>Figure 67</b> : Chromatogrammes des fractions 8 (en noir) et 9 (en rouge) du sol P9 du site de creosotage.....	186
<b>Figure 68</b> : Coefficient de réponse des composés développés en GC/MS par rapport aux étalons de quantification utilisés. ....	187
<b>Figure 69</b> : Induction de l'activité AhR du benzo(a)pyrene et de la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine chez les cellules PLHC-1 après 4h d'exposition. ....	188

## Table des Tableaux

<b>Tableau 1</b> : Nombre de sites contaminés et potentiellement contaminés dans différents pays européens.....	29
<b>Tableau 2</b> : Méthode d’inventaire des sites et des sols contaminés dans différents pays européens.....	38
<b>Tableau 3</b> : Méthode de financement pour les sites contaminés orphelins dans différents pays européens.....	38
<b>Tableau 4</b> : Composés suivis dans les sols contaminés français.....	39
<b>Tableau 5</b> : Somme des équivalents toxiques avec comme molécule de référence la 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzodioxine- impliquant une action de décontamination.....	40
<b>Tableau 6</b> : Valeurs de référence nécessitant une action de décontamination selon le droit allemand.....	40
<b>Tableau 7</b> : Valeurs de référence dans le sol nécessitant une action de décontamination selon le droit Suisse.....	41
<b>Tableau 8</b> : Différentes études avec l'approche EDA.....	43
<b>Tableau 9</b> : Nom des échantillons de sols avec leur localisation et les premières observations de terrain.....	51
<b>Tableau 10</b> : Description des points de prélèvement des sols du milieu naturel situés à proximité du site industriel d'étude.....	55
<b>Tableau 11</b> : Caractéristiques des points de prélèvement de sol sur le site industriel étudié.....	55
<b>Tableau 12</b> : Teneur limite réglementaire des polluants suivis dans les boues pour qu'elles soient utilisables en épandage selon la réglementation française.....	57
<b>Tableau 13</b> : Avantages et inconvénients de l'ensemble des méthodes d'extraction des matrices solides.....	62
<b>Tableau 14</b> : Méthodes d'extractions utilisées sur les matrices solides lors de l'approche EDA trouvées dans la littérature.....	63
<b>Tableau 15</b> : Paramètres de la méthode d'extraction par ASE pour l'analyse dirigée par l'effet.....	64
<b>Tableau 16</b> : Paramètres de la méthode d'extraction par ASE pour un fractionnement lié à une extraction séquentielle.....	65
<b>Tableau 17</b> : Paramètres d'extraction pour les analyses ciblées sur les PCB.....	66
<b>Tableau 18</b> : Paramètres d'extraction pour les analyses ciblées sur les HAP.....	67
<b>Tableau 19</b> : Paramètres d'injection en GC-ECD pour l'analyse des PCB présents dans les sols.....	68
<b>Tableau 20</b> : Molécules chlorées analysées dans les sols recherchées par GC-ECD.....	69
<b>Tableau 21</b> : Paramètres d'analyse par GC-MS pour l'analyse des HAP présents dans les sols.....	70
<b>Tableau 22</b> : HAP analysés lors du dosage par GC-MS.....	70
<b>Tableau 23</b> : Paramètres d'analyse par GC-MS pour l'analyse en mode « inconnu » des échantillons et une comparaison d'empreinte chromatographique.....	71
<b>Tableau 24</b> : Exemple de récepteurs cibles et de ligands naturels, synthétiques et xénobiotiques.....	75
<b>Tableau 25</b> : Listing des lignées cellulaires couramment utilisées pour mesurer l'activité EROD.....	77
<b>Tableau 26</b> : Paramètres de lecture des microplaques lors du bioessai impliquant l'activité AhR.....	79
<b>Tableau 27</b> : Paramètres de lecture des microplaques lors du bioessai impliquant l'activité ER/Luciférase.....	81
<b>Tableau 28</b> : Paramètres d'élution utilisés pour le fractionnement en phase inverse.....	87
<b>Tableau 29</b> : Paramètres d'élution utilisés pour le fractionnement en phase normale.....	88
<b>Tableau 30</b> : Composés présents dans la solution testée pour la répétabilité, classés selon leur activité biologique.....	89
<b>Tableau 31</b> : Paramètres pour l'analyse des fractions par GC-ToF.....	92
<b>Tableau 32</b> : Paramètres chromatographiques pour l'analyse par LC-Q/ToF.....	94
<b>Tableau 33</b> : Paramètres de la source d'ionisation des molécules en LC-Q/ToF.....	94
<b>Tableau 34</b> : Comparaison des volumes d'extrait utilisés ainsi que des concentrations efficaces à 20% (EC20 et IC20) entre les différents bioessais de toxicité aiguë et d'activation du récepteur Ah.....	108
<b>Tableau 35</b> : Résumé des différents bioessais testés avec leurs spécificités et leur compatibilité avec la démarche EDA.....	110
<b>Tableau 36</b> : Concentrations de 18 HAP et de 2 composés aromatiques polycycliques soufrés (en µg/g de sol sec) dans les sols du site contaminé par la créosote.....	120



<b>Tableau 37</b> : Activités biologiques théoriques (Teq-chim) dues aux 16 HAP de la liste US-EPA et expérimentales (TEQ-bio) des sols du site de créosotage. ....	121
Tableau 38 : Concentration (en µg/g de sol) des différents HAP dosés dans les sols de l'usine de traitement de gaz. ....	124
Tableau 39 : Concentrations (en ng/g de sol sec) des différents PCB dosés dans les sols de l'usine de traitement de gaz.....	125
Tableau 40 : Toxic equivalent factor (TEF ou REP) fournis en 2005 par l'organisation mondiale de la santé de 4 PCB présents dans les sols étudiés. ....	126
Tableau 41 : Activité biologique théorique (Teq-chim) due aux 16 HAP de la liste US-EPA et expérimentaux (TEQ-bio) des sols de l'usine de traitement de gaz .....	127
<b>Tableau 42</b> : Concentration en œstrone et œstradiol des fractions 15 et 16 de la boue Louis Fargue et pourcentage d'activité expliqué par ces composés.....	172
<b>Tableau 43</b> : Composition en HAP de la boue Louis Fargues (en ng/g de boue sèche).....	173

## **Publications et communications**

### **Articles en préparation :**

**Delafoulhouze, M.**, Le Menach, K., Aït-Aïssa, S., Lascourreges, J-F., Atteia, O. & Budzinski, H. Application of effect-directed analysis to identify organic pollutants in industrial soil polluted by creosote (p151)

**Delafoulhouze, M.**, Devier, M-H., Le Menach, K., Geneste, E., Lascourreges, J-F., Aït-Aïssa, S., Atteia, O. & Budzinski, H. Identification of AhR-ligands by an effect directed analysis approach in a contaminated soil of a gas treatment plant (p181).

### **Communications orales :**

**Delafoulhouze, M.**, Lascourreges, J-F., Aït-Aïssa, S., Atteia, O. & Budzinski, H. (2015). La complémentarité des bioessais et de la bioanalyse dans la compréhension des risques écotoxicologiques sur les sols pollués. Séminaire Innovasol : Gestion des sites et sols pollués : de la recherche à l'application. Comment accélérer le processus ?, 6-7 Octobre, Arcachon.

### **Communication par affiches :**

**Delafoulhouze, M.**, Devier, M-H., Aït-Aïssa, S. & Budzinski, H. (2013). Méthode d'identification des polluants organiques présents dans les sols industriels: Application de l'approche EDA (Effect directed analysis), combinaison d'outils biologiques et physico-chimiques pour l'analyse des contaminations organiques complexes. Pollutec 2013, 3-6 Décembre, Paris

**Delafoulhouze, M.**, Devier, M-H., Aït-Aïssa, S. & Budzinski, H. (2014). Développement de l'analyse dirigée par les effets pour identifier les polluants de sols industriels. 3ème rencontres nationales de la Recherche sur les sites et sols pollués (ADEME), 18-19 Novembre, Paris.

**Delafoulhouze, M.**, Aït-Aïssa, S., Atteia, O. & Budzinski, H. (2015). Effect-direct analysis of AhR-active organic compounds in industrial soils contaminated by creosote. 25<sup>th</sup> European SETAC, 3-7 May, Barcelona.

**Delafoulhouze, M.**, Devier, M-H., Aït-Aïssa, S., Atteia, O. & Budzinski, H. (2015). Identification d'activateurs du récepteur Ah dans des sols industriels contaminés pour des mélanges organiques. SEFA, 30 Juin au 1<sup>er</sup> Juillet, Bordeaux.

## **Introduction générale**

Avec le développement industriel du XX<sup>ème</sup> siècle, de l'agriculture intensive et l'augmentation de la population, la production de substances chimiques a augmenté exponentiellement depuis le siècle dernier. De nos jours, ce n'est pas moins de 100 000 substances chimiques qui sont utilisées dans notre vie quotidienne. Elles sont au centre de notre économie et jouent un rôle important que ce soit au niveau de l'emploi, du commerce ou de l'économie internationale. Cependant, nombre de ces substances peuvent avoir un impact sur nos écosystèmes et affecter durablement notre environnement. La prise de conscience de cette pression anthropique d'origine chimique sur les écosystèmes est marquée en 1972 par la déclaration de Stockholm où pour la première fois, les questions écologiques sont placées au plan international. Dès lors, la « révolution environnementale » est en marche. D'autres conventions et protocoles internationaux suivront dans cette voie tels que la convention de Vienne (1982) et le protocole de Montréal (1987) sur la protection de la couche d'ozone, la convention de Bâle (1989) afin de réduire les mouvements transfrontaliers des déchets dangereux, le sommet de Rio (1992) et la convention de Rotterdam (1998).

Suite à ces accords internationaux, des réglementations nationales visant à assurer un haut niveau de protection de la santé humaine et environnementale ont aussi été instituées par les trois principaux producteurs, exportateurs et utilisateurs de substances chimiques. Ces textes tendent à limiter ou interdire la commercialisation de substances chimiques dangereuses. Ces programmes sont le 'Toxic Substances Control Act' (TSCA) mis en place aux Etats-Unis en 1976, le 'Canadian Environmental Protection Act' (CEPA) créé en 1999 et l'instauration du règlement de 'Registration, Evaluation, Authorization and restriction of CHemicals' (REACH) dans l'Union Européen en 2007. Malgré tout cela, l'emploi de substances chimiques augmente continuellement ; ainsi le Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE) prévoit une augmentation globale de 3% des ventes de produits chimiques par an jusqu'à l'horizon de 2050. Il en résulte une dispersion d'un large spectre de molécules dans l'environnement qui peuvent avoir un impact plus ou moins important sur la santé humaine ou les écosystèmes.

Les mélanges complexes présents dans l'environnement pouvant avoir un large spectre d'impacts, il est de ce fait compliqué d'identifier quels contaminants sont à l'origine de la toxicité du milieu et de conclure sur le risque environnemental. Malgré tout, à l'heure actuelle, les analyses ciblées restent prédominantes pour l'évaluation de ce risque. Cette approche non exhaustive est problématique si les contaminants en cause sont inconnus. C'est pourquoi développer des analyses non ciblées couplant des bioessais *in vitro* et des analyses chimiques afin d'effectuer des diagnostics environnementaux semble être une solution acceptable. Elles permettraient d'identifier les molécules responsables d'effets délétères et ainsi améliorer l'évaluation du risque. Une de ces approches de bioanalyse a été développée par des chercheurs dans les années 80. Elle est appelée 'analyse dirigée par l'effet' (EDA) et semble prometteuse dans l'identification de contaminants responsables d'effets biologiques. En combinant une simplification de l'échantillon par un fractionnement physicochimique, des analyses biologiques et chimiques, elle permet d'identifier les polluants et de quantifier leurs contributions aux les effets toxiques d'un mélange (Brack, 2003).

Du fait de la réglementation (directive cadre sur l'eau et directive air), les milieux aquatiques et atmosphériques font l'objet de nombreuses études, suivis et leur contamination est de fait bien documentée. Contrairement à cela, la contamination des sols ne fait pas l'objet d'une réglementation spécifique. Il en découle que cette matrice est moins étudiée et moins protégée des dégradations anthropiques quelles soient chimiques ou physiques. En France, le seul texte réglementant la contamination des sols est le code de l'environnement où il est explicitement demandé aux industriels propriétaires d'installations classées pour la protection

de l'environnement (ICPE) de décontaminer les sols et les remettre dans l'état d'origine antérieure à l'exploitation. Cependant le flou persiste quant à la désignation « état originel » et les performances de dépollution sont non spécifiées. De même, un vide réglementaire existe au niveau européen en ce qui concerne la protection des sols. Seule une proposition de directive cadre pour les sols a été effectuée en 2006 mais son application est toujours en attente. Pourtant le sol est un patrimoine non renouvelable et d'une importance primordiale pour notre environnement et notre économie qui demanderait, tout comme l'air et l'eau, une protection chimique, physique et biologique importantes.

La prise de conscience écologique, l'évolution du cadre réglementaire en cours ainsi que le projet de directive cadre sur les sols laisse envisager une accentuation de l'intérêt pour l'étude des sols et pour leur préservation. C'est pourquoi il est important de mettre en place de nouvelles techniques afin de mieux évaluer la toxicité des sols, le risque qui leur est associé pour la santé humaine ou environnementale et ainsi permettre un traitement adéquat de ceux-ci.

Dans ce contexte, il est important que les industriels développent des méthodes afin de mieux identifier les polluants responsables de la toxicité des sols de leurs sites et ainsi améliorer la caractérisation du risque lié à la pollution. Avec une amélioration du diagnostic, il sera possible en fonction des polluants identifier de choisir la technologie la plus adaptée pour la rémédiation des sols et permettre une meilleure réhabilitation des sites pollués. C'est ici que le développement d'une démarche EDA porte tout son intérêt. Elle permettrait d'identifier et d'évaluer la contribution des polluants responsables de la toxicité des sols industriels et ainsi améliorer le diagnostic environnemental. Cette démarche appliquée à différentes étapes de la rémédiation des sols pollués serait aussi un outil utile afin de vérifier que les techniques de dépollution employées ne sont pas à l'origine d'une modification de la toxicité des sols due à la transformation des contaminants originels en produits de dégradation plus toxiques. L'application de cette démarche permettrait d'améliorer la performance du diagnostic des sols pollués, de leur rémédiation et ainsi être à l'origine d'un gain de temps, d'argent et de performance dans la gestion de ces sites pollués.

L'objectif principal de cette thèse est donc de développer une démarche EDA dans un contexte industriel afin d'identifier les polluants responsables de la toxicité de sols industriels pollués.

Ce manuscrit s'organise en trois grandes parties :

- ✓ En premier lieu, il présente une synthèse bibliographique afin de replacer le sujet dans son contexte scientifique et réglementaire. Seront abordés les caractéristiques des sols, les polluants organiques repertoriés dans le cadre de la pollution industrielle ainsi que les approches d'identification de la pollution.
- ✓ La deuxième partie traite des méthodes utilisées et de l'approche scientifique pour mener à bien ce projet.
- ✓ La troisième partie est une revue des résultats obtenus lors de ces trois ans de travail et la discussion s'y rapportant.

## **I. Synthèse bibliographique**

## **I. Introduction**

Contrairement à l'air ou l'eau dont la détérioration est visuelle, le sol a été considéré pendant des années comme une "boîte noire" inerte. Par conséquent, sa détérioration a été ignorée pendant de nombreuses années.

Ces dernières années, la conscience de l'importance écologique du sol est de plus en plus reconnue. Le sol est maintenant considéré comme un écosystème remplissant de nombreuses fonctions écologiques essentielles pour les milieux aquatiques ou atmosphériques.

L'une des menaces anthropiques affectant les sols est la contamination chimique. Elle est le résultat de nos activités et peut être la source de sites contaminés qui présentent un risque pour la santé humaine ou environnementale. La gestion de ces sites pollués ne fait pas encore l'objet de réglementations harmonisées au niveau européen. Il en résulte des lacunes que ce soit dans leur identification ou leur réhabilitation. Pour améliorer la gestion de ces sites contaminés, il est nécessaire de travailler en amont de leur gestion en mettant au point un diagnostic chimique pertinent et de se concentrer sur les molécules qui peuvent être à l'origine d'effets biologiques délétères. Une approche relativement nouvelle pour relier la contamination chimique et l'impact biologique est la bioanalyse. Déjà utilisée pour les environnements aquatiques et atmosphériques, son utilisation pourrait être très intéressante dans le cas des sols contaminés.

Après une brève présentation du sol et de ses fonctions, cette synthèse bibliographique présente les différentes menaces qui pèsent sur le sol. Elle se concentre ensuite sur le problème des sols contaminés ainsi que sur le diagnostic de cette contamination.

## **II. Le sol et son importance**

Le sol est la couche supérieure friable de la croûte terrestre continentale située entre le substratum rocheux et l'atmosphère. Son épaisseur est de quelques centimètres à quelques mètres. La nature et la formation des sols résultent de cinq facteurs: le climat, le substratum rocheux, la biocénose, le relief et le temps (figure 1). Des milliers, voir des millions d'années sont nécessaires pour obtenir un sol mature, ce qui en fait une ressource non renouvelable et rare (Duchaufour, 1984; Haygarth & Ritz, 2009).

Cette ressource possède de nombreuses fonctions écologiques. Le sol intervient par exemple, dans de nombreux cycles biogéochimiques essentiels aux écosystèmes tels que celui de l'eau ou des nutriments (azote, carbone, phosphore, potassium et soufre). Ces fonctions font que le sol fournit un ensemble de bénéfices à nos sociétés également connus sous le nom de services écosystémiques (Daily, 1997 ; MEA, 2005 ; Boyd et Banzhaf, 2007). Ils sont classés selon quatre catégories (Figure 2).

- Les services de supports : ils permettent au sol de se renouveler et d'assurer son bon fonctionnement. Ils comprennent la production primaire issue des plantes terrestres, la formation du sol, le maintien de la biodiversité du sol que ce soit au niveau des végétaux ou de la faune et les cycles des éléments nutritifs en ce qui concerne leur stockage ou leur transformation.

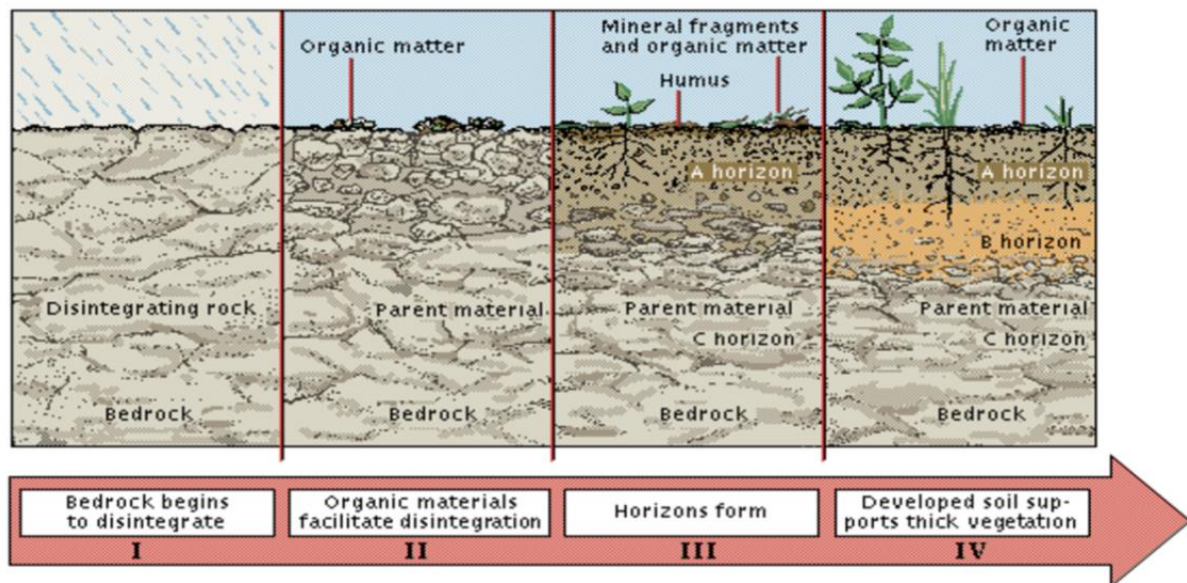
- Les services d'approvisionnement correspondent à ce que le sol fournit. Cela comprend des habitats pour le biote, le soutien à la construction de nos infrastructures, l'eau de stockage

(eaux souterraines), la fourniture de nourriture, de biomatériaux (bois), des matières premières (sable, minéraux ...) et des ressources biologiques (matériel biologique).

- Les services de régulation comme celle de l'eau que ce soit pour sa qualité (filtration par les sols) ou sa quantité (régulation du débit de l'eau), des gaz et du climat (intervention dans le cycle et le stockage du carbone).

- Les services culturels pour notre société tel la conservation de notre héritage historique (conservation archéologique), les services de loisirs (activités sportives) et les services cognitifs (spirituelle, scientifique ...).

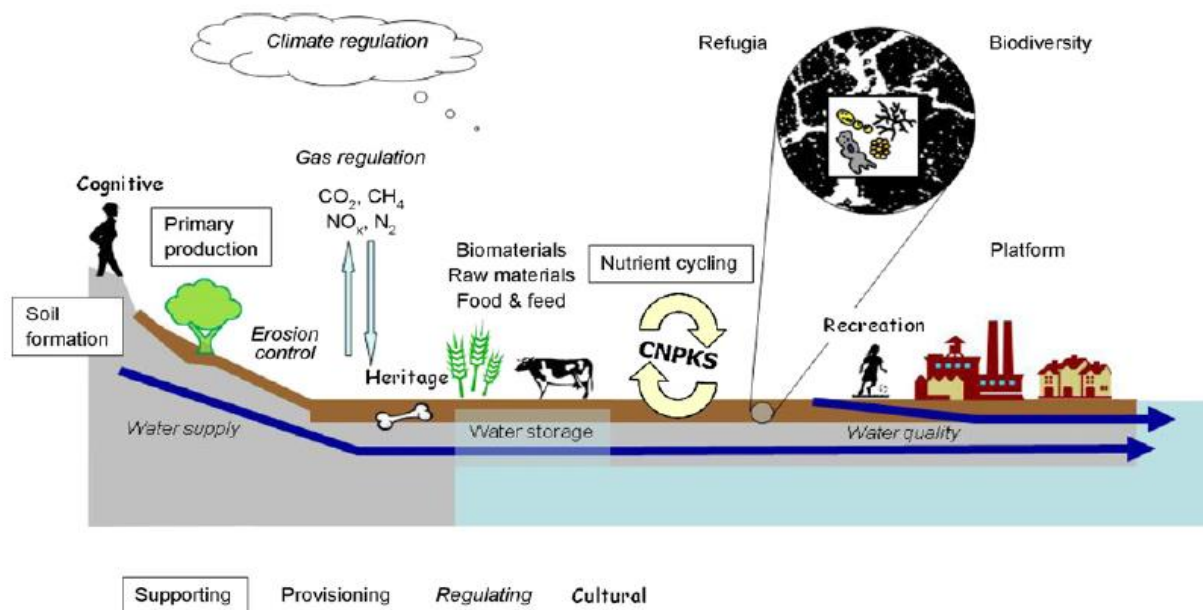
Soil Formation Over Time



**Figure 1:** Les différentes étapes de la formation du sol. Source : <http://sjsearthscience.blogspot.fr>

Costanza et al. (1997) ont évalué financièrement ce que les services écosystémiques fournissent à nos sociétés par an. À l'échelle mondiale, les services fournis par les biomes terrestres impliquant les sols ont une valeur moyenne de 12 319 milliards de dollars par an. Les sols ont donc un intérêt économique et écologique important. Toutefois, l'activité humaine affecte leurs bons fonctionnements et leur qualité, empêchant les sols d'assurer leurs fonctions écologiques et les services écosystémiques qui en découlent.





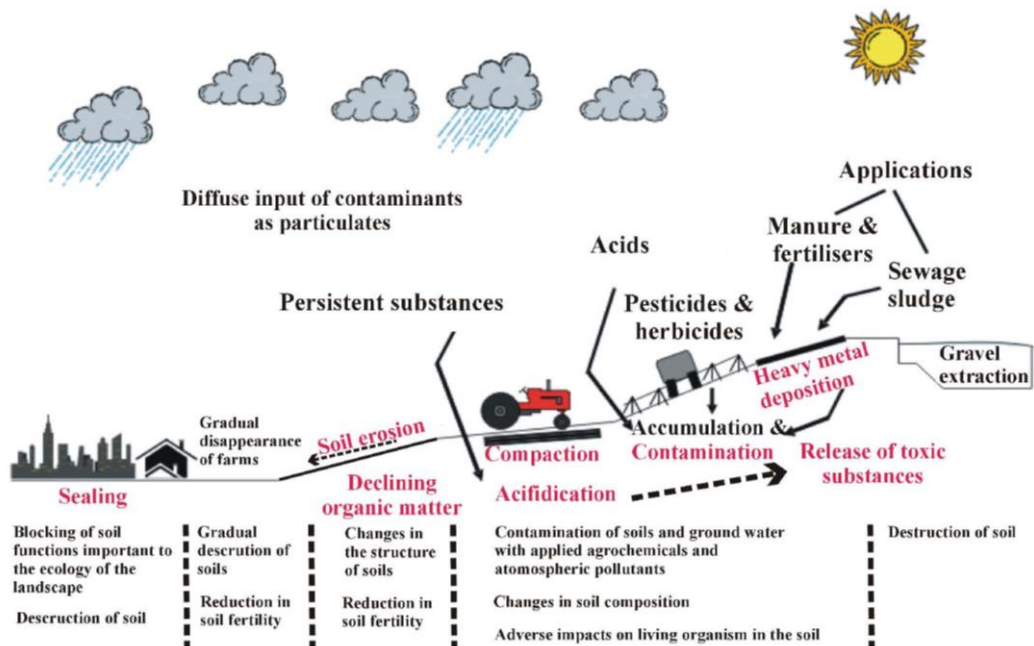
**Figure 2** : Les différents types de services écosystémiques fournis par le sol (Haygarth & Ritz, 2009)

### III. Les menaces affectant les sols

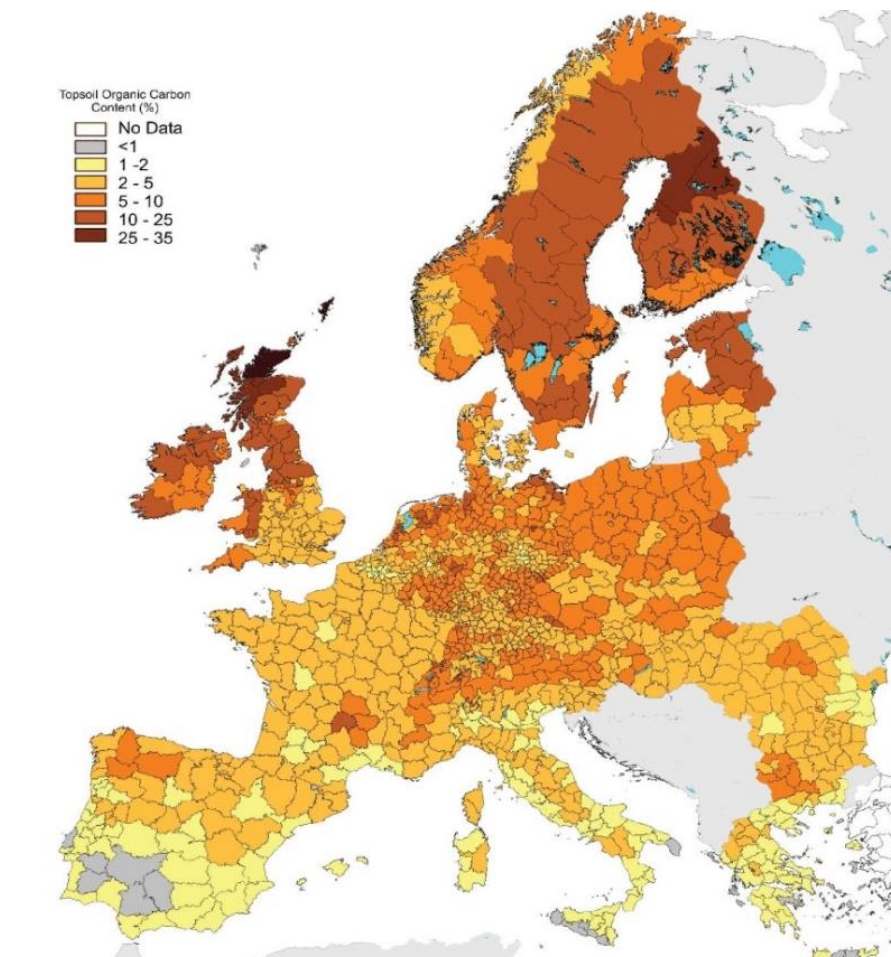
En dépit de la fragilité et de l'utilité des sols, l'Union Européenne a identifié plusieurs menaces anthropiques responsables de la dégradation des sols (Figure 3). Ces menaces affectent 52 millions d'hectares européens représentant plus de 16% de la superficie totale du territoire (<http://eussoils.jrc.ec.europa.eu>).

#### 1. La perte de matière organique

La matière organique provient principalement de la transformation de débris végétaux et des restes d'animaux par des organismes vivant dans le sol. La matière organique est impliquée dans plusieurs processus servant au stockage des nutriments et de l'eau indispensable à la fertilité des sols. Elle constitue également un stock de carbone organique qui représente jusqu'à 50% de sa masse. Elle joue donc un rôle important dans la séquestration du carbone et le changement climatique (Dobbie et al., 2011). La matière organique est également impliquée dans la structuration et l'aération du sol limitant le compactage. Cependant, ces dernières années, une diminution de la teneur en matière organique du sol a été observée induisant une modification de la structure des sols, une réduction de la fertilité et une dégradation accrue. La diminution en teneur organique des sols d'origines anthropiques est principalement due à des changements dans les utilisations agricoles, urbaines ou forestières des sols (Foley et al., 2005). Les sols avec moins de 1,7% de matière organique sont considérés dans un état de pré-désertification (<http://eussoils.jrc.ec.europa.eu>). La carte européenne de la teneur des sols en matière organique montre une disparité dans les différents pays dans un axe nord-sud où les sols des pays d'Europe du Sud ont des teneurs en matières organiques entre 1-2% (Figure 4) qui sont donc considérés en pré-désertification.



**Figure 3 :** Les différentes menaces affectant les sols. Source : [http://eussoils.jrc.ec.europa.eu/projects/soil\\_atlas/pages/109.html](http://eussoils.jrc.ec.europa.eu/projects/soil_atlas/pages/109.html)



**Figure 4 :** La teneur en matière organique des sols européens. Source : [http://eussoils.jrc.ec.europa.eu/projects/soil\\_atlas/pages/112.html](http://eussoils.jrc.ec.europa.eu/projects/soil_atlas/pages/112.html)

## **2. L'imperméabilisation des sols**

L'imperméabilisation du sol correspond au fait de le recouvrir par un matériau imperméable. Cette menace provient principalement du développement urbain et la construction d'infrastructures (bâtiments, routes ...). Elle touche particulièrement les zones urbaines et péri-urbaines. Les sols imperméables sont impropres à l'agriculture ou à la sylviculture et ne peuvent plus remplir leurs fonctions écologiques. En 2006, la superficie totale des sols scellés a été estimée à environ un million de kilomètres carrés ce qui correspond à 2,3% du territoire de l'UE et à une moyenne de 200 m<sup>2</sup> de sol imperméabilisé par habitant (Commission européenne, 2012).

## **3. La salinisation**

La salinisation correspond à l'accumulation de sels (potassium, magnésium, calcium, chlorure, sulfate, carbonate, bicarbonate ou sodium) dans le sol. Elle peut être naturelle ou d'origine anthropique. L'augmentation de la teneur en sel dans les sols est principalement due à une pratique agricole où l'irrigation se fait avec de l'eau riche en sels ou à l'utilisation intensive d'engrais. Cette salinité est principalement observée dans la région de faible pluviométrie où l'évapotranspiration est importante et où le lessivage du sol est faible. Elle inhibe le développement des plantes et affecte le métabolisme des organismes du sol en réduisant la quantité d'eau et de nutriments assimilables. En outre, les sels deviennent toxiques à des concentrations élevées.

En Europe, 1 à 3 millions d'hectares sont touchés par la salinisation. Les principaux pays concernés sont la Roumanie, la Hongrie, la Grèce, l'Italie et l'Espagne (Communauté européenne, 2009).

## **4. L'érosion des sols et les glissements de terrain**

L'érosion (et les glissements de terrain) est un processus naturel se produisant sur des échelles de temps géologiques. Elle est à l'origine de la formation du sol et du façonnage du paysage que nous voyons aujourd'hui.

La préoccupation actuelle est l'observation de l'érosion accélérée des sols provoquant sa disparition et laissant apparaître le substratum rocheux. Les origines de cette érosion accélérée sont les pratiques agricoles inappropriées, le surpâturage, la déforestation et les activités de construction qui laissent le sol à nu le rendant sensible à l'érosion éolienne et/ou pluviale. Le sol se forme lentement, les pertes de sol de plus de 2t/ha/an sont actuellement considérées comme irréversible dans un intervalle de 50 à 100 ans (Grimm et al, 2002;. Nunes, 2011). Cependant des études ont montré que les tempêtes peuvent causer la perte de sol allant de 20 à 40 t/ha (avec des extrêmes à 100 t/ha). Ces tempêtes se produisant en moyenne une fois tous les deux ou trois ans en Europe (Morgan, 1992), il en résulte une perte de sol bien au-dessus du taux des pertes considérées comme irréversibles dans certaines zones du territoire européen.

## **5. Le compactage du sol**

Le compactage du sol est le résultat d'une distorsion du sol qui modifie sa structure et conduit à une réduction de sa porosité, de sa perméabilité et de l'activité biologique. En raison de la réduction de la porosité, l'eau ne pénètre plus et ruisselle à la surface du sol, ce qui augmente le risque d'érosion. Le processus de compactage peut être initié par des roues, des pistes, des rouleaux ou par des passages d'animaux.

## **6. Le changement ou la diminution de biodiversité**

Le changement de la biodiversité est surtout une conséquence de la dégradation des sols conduisant à une destruction de l'habitat du biote et donc à une perte de la biodiversité. Les organismes du sol sont impliqués dans de nombreuses fonctions écologiques du sol (par exemple, des cycles des éléments nutritifs). Un changement dans les populations d'organismes du sol peut de ce fait affecter ces fonctions.

## **7. La contamination des sols**

Le sol agit comme un puit pour l'ensemble des substances rejetées dans l'environnement lors des activités humaines. Par conséquent, de nombreux polluants s'accumulent dans le sol du fait des propriétés spécifiques de filtration et de tampon du sol. La contamination est effective lorsque la concentration de ces substances est supérieure à une valeur de fond (présence naturelle) définie ou suffisamment élevée pour provoquer un risque potentiel pour la santé humaine, les plantes, les animaux, les écosystèmes ou les autres milieux environnementaux (par exemple: les eaux souterraines). Si tel est le cas, ces substances sont alors considérées comme des polluants.

Il existe deux types de pollution des sols:

- La pollution ponctuelle due au dépôt ou à la pulvérisation de mélanges ou de substances dans une zone limitée et où il est possible d'identifier la source.
- La pollution diffuse due à une dispersion sur de grandes surfaces des contaminants et dont la source est difficile à identifier.

Les deux types de pollution peuvent à la source d'une:

- pollution accidentelle caractérisée par son imprévisibilité qui dépend du moment, des circonstances, du lieu et des conséquences de l'accident ainsi que du type et la quantité de polluant(s) déversée. Des exemples de pollution accidentelle sont les épaves de l'Amoco Cadiz en 1978 et de l'Erika en 1999.
- pollution chronique où un approvisionnement en continu du polluant du à des fuites ou du lessivage. Le polluant peut s'accumuler au fil du temps et alors provoquer des effets plus importants que lors d'une pollution accidentelle.

La contamination locale est principalement due à l'utilisation intensive de certaines molécules lors des activités industrielles/commerciale ou à l'accumulation de déchets. Celle-ci est la source de sites contaminés pour lesquels la pollution observable peut être due à des activités passées ou actuelles. Les origines de la pollution des sols (et des eaux souterraines) sont variées. Elle peut être causée par des pertes lors de la production, des accidents industriels ou au lessivage des substances dangereuses dans les sites d'élimination des déchets.

Ces sites peuvent présenter un danger pour l'environnement en raison de l'émission de polluants ; ils sont suivis en Europe et leurs caractéristiques sont fournies.

## **IV. Caractéristiques des sites contaminés en Europe**

L'Agence européenne pour l'environnement (AEE) dont 33 pays sont membres, est responsable de la préservation et de la surveillance de l'environnement européen. L'une de ses

activités est de suivre tous les sites contaminés européens. Deux appellations existent pour qualifier les sites contaminés:

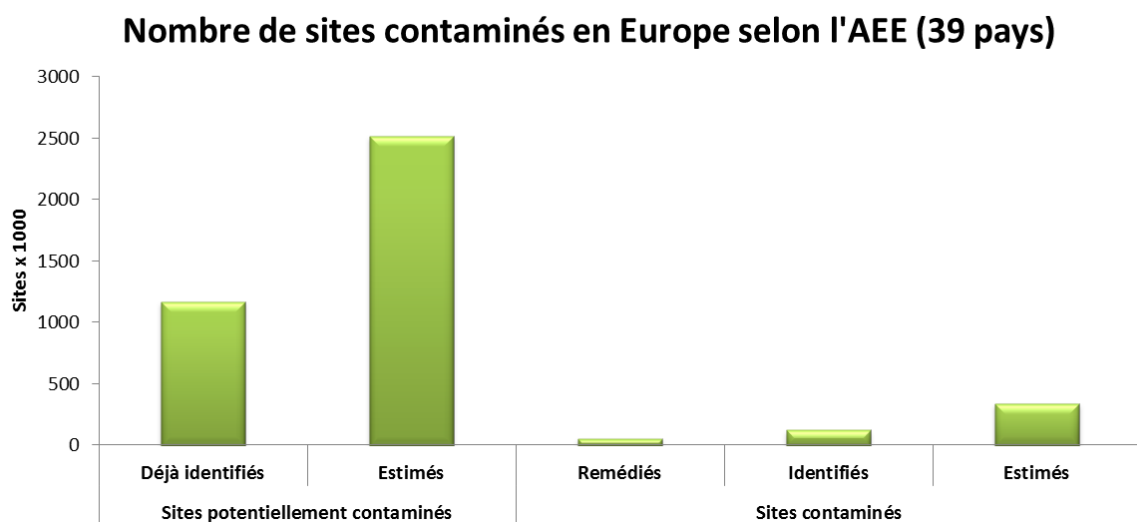
- Le terme «site contaminé» (SC) fait référence à une zone définie, où la contamination du sol a été identifiée et qui présente un risque potentiel pour les humains, l'eau et d'autres écosystèmes.
- Un site potentiellement contaminé (SPC) correspond à un site avec une contamination suspectée mais non vérifiée. Ces sites nécessitent des enquêtes plus approfondies afin de se prononcer sur le risque qu'ils représentent pour la santé humaine et l'environnement.

Une étude a été menée dans 39 pays européens afin d'avoir une vue d'ensemble sur les contaminations locales. Toutes les informations concernant ces sites et sols pollués ont été examinées par Panagos et al. en 2013 et ont fait l'objet d'un rapport de l'AEE en 2014 (Van Liedekerke et al. 2014). Les informations clés à retenir sur les sites et sols pollués européens sont citées ci-dessous.

### 1. Comptabilisation des sites et sols pollués ou potentiellement contaminés en Europe.

L'Agence européenne pour l'environnement estime que plus de 2,5 millions de sites potentiellement contaminés (SPC) existent partout en Europe, bien que seulement 1,2 millions d'entre eux ont déjà été identifiés. Le nombre estimé de sites pour lesquels la contamination a été avérée (SC) est de 342 000 ; seulement 127 380 ont été identifiés et 58 340 ont été réhabilités (Figure 5).

La moyenne européenne estimée de SPC est de 41,7 pour mille habitants et de 5,7 pour les SC. Les pays avec le nombre le plus important de sites estimés contaminés sont la Belgique et la Finlande (tableau 1).



**Figure 5:** Nombre estimé de sites potentiellement contaminés et contaminés en Europe. L'estimation est faite pour 39 pays (sources: AEE)

**Tableau 1:** Nombre de sites contaminés et potentiellement contaminés dans différents pays européens. N.D : Non déterminé.

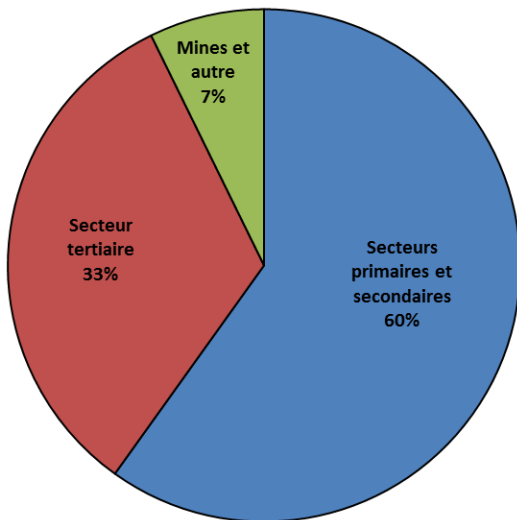
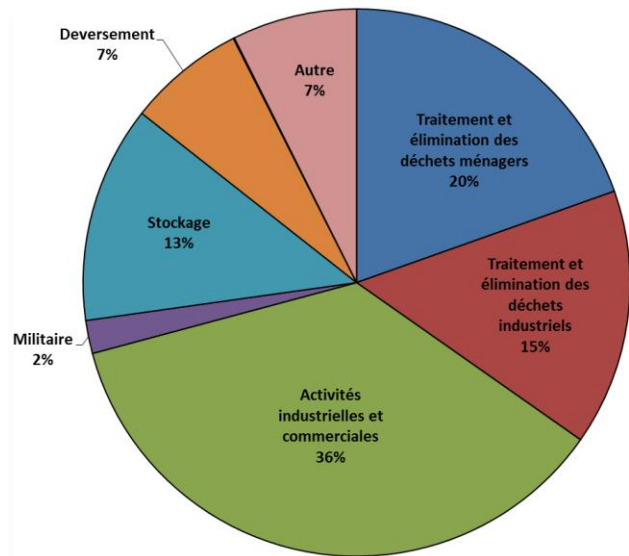
<b>Pays</b>	<b>Nombre estimés de SPC/1000 habitants</b>	<b>Nombre estimés de SC/1000 habitants</b>
Moyenne	<b>41.7</b>	<b>5.7</b>
Belgique (Flandres)	137.95	20.8
Finlande	35.53	19.9
Lithuanie	27.32	9.1
Malte	13.1	1.1
Suisse	12.71	4.3
Autriche	10.88	0.7
Slovaquie	1.9	1.7
Hongrie	1.03	0.9
Estonie	N.D	0.7
Ex-République yougoslave de Macédoine	N.D	0.3
Serbie	N.D	0.1
Royaume-Uni	47.8	N.D
France	46.15	N.D
Lettonie	29.84	N.D
Chypre	1.42	N.D

En général, les zones densément peuplées et industrialisées sont les plus susceptibles d'abriter des sites contaminés. Ceci suggère que les zones potentiellement les plus touchées en Europe sont les zones industrielles du Rhône et du Nord-Pas de Calais en France, le Rhin-Ruhr et de la Sarre en Allemagne, les villes du Royaume-Uni, la Belgique, les Pays-Bas et le nord de l'Italie (Basol, Novembre 2013)

## **2. Les sources de contamination des sites et sols pollués**

Les sources de contamination des sols sont variables. Cependant, certains secteurs et domaines d'activité sont plus polluants que d'autres. Les secteurs primaire et secondaire sont les sources majoritaires de pollution et sont responsables de 66% des sites contaminés existants. Le reste est réparti entre le secteur tertiaire (33%) et le secteur minier (7%) (voir figure 6A). L'industrie pétrolière et la sidérurgie font partie du secteur primaire et sont connues pour être les principales sources de pollution. Ceci explique pourquoi ce secteur est la cause de la majorité des sites et sols pollués. En ce qui concerne les services, les contributeurs majoritaires sont les stations-service (Piedrafita Carnicer, 2007).

Les domaines d'activités polluantes sont principalement les activités commerciales et industrielles (36%) ainsi que la gestion et le traitement des déchets municipaux (20%) et industriels (15%) (voir la figure 6B).

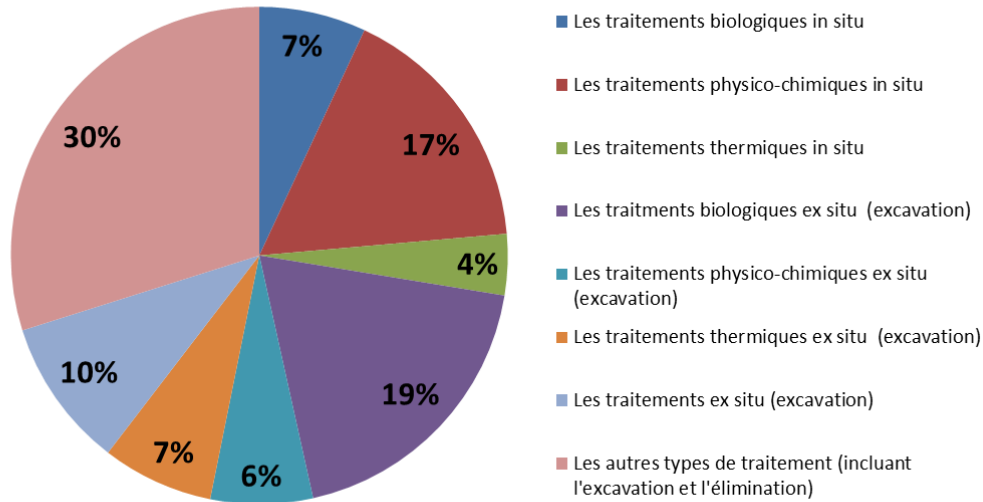
**A****B**

**Figure 6 :** Secteurs et sources d'activité à l'origine de sites contaminés en Europe. Les données sont exprimées en pourcentage. Source: AEE.

### 3. La gestion et les coûts des sites contaminés ou potentiellement contaminés

La gestion a pour but de nettoyer le sol des sites contaminés afin de minimiser les risques potentiels pour la santé humaine ou l'environnement. Il est organisé en trois étapes. La première consiste à diagnostiquer l'état de la contamination par l'identification et la quantification des composés chimiques anormalement présents dans les sols du site. La seconde appelée assainissement vise à nettoyer les contaminants du sol en abaissant la teneur du sol pollué, voire à éliminer complètement la molécule(s) exogène. Il existe de nombreuses méthodes pour l'assainissement des sols en Europe, cependant, les plus utilisés sont l'excavation et l'enfouissement (30%), l'excavation et le traitement biologique ex situ des sols (19%) ainsi que les traitements physiques et chimiques directement sur le site (17%) (voir figure 7). Enfin des mesures post-traitement peuvent être mises en place pour veiller à ce que le site ne présente plus de risques et puisse soutenir une nouvelle activité.

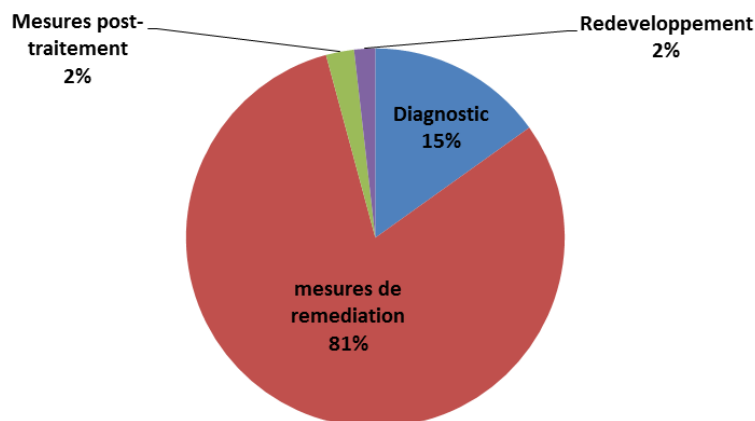
## Les méthodes de rémédiation des sols contaminés



**Figure 7 :** Méthodes d'assainissement des sites pollués utilisées en Europe. Les données sont exprimées en pourcentage. Source: AEE

Tout cela a un coût. Pour la plupart des sites en combinant les coûts de diagnostic et de réduction des risques (d'assainissement), il se situe entre 55.000 et 550.000€. L'assainissement reste l'étape la plus coûteuse de gestion des sites avec des dépenses entre 50.000 et 500.000 € pour 40% des sites et compte pour 81% des montants impliqués, le prix du diagnostic est égal à 15% de la gestion des dépenses avec une gamme de prix allant de 5000 à 50.000 €. La différence du coût de la gestion des sites dépend du niveau de contamination du site mais également de sa superficie.

## Répartition des coûts entre les différentes étapes de la gestion des sols contaminés



**Figure 8 :** Répartition des coûts moyens pour la gestion d'un site contaminé. Les données sont exprimées en pourcentage. Source: AEE

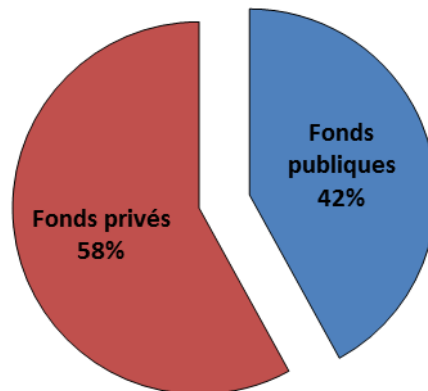
En ce qui concerne l'origine des fonds de gestion, deux types existent. En règle générale, le principe du «pollueur-payeur» s'applique, ce qui implique que le pollueur prend à sa charge



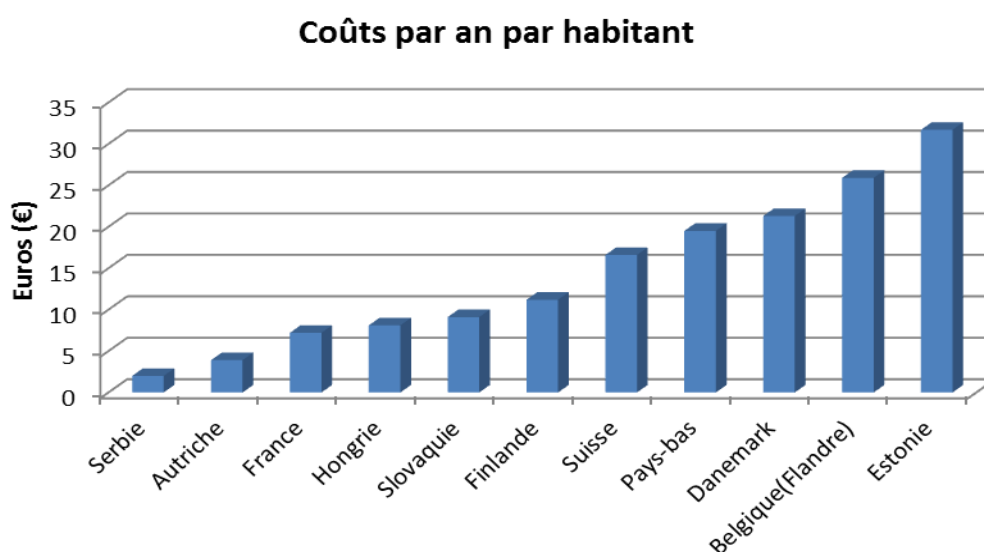
les coûts liés à l'assainissement du site. Mais certains sites sont orphelins, pollués par des personnes physiques ou morales sans liquidités ou qui ne peuvent pas être tenues pour responsables. Dans ce cas, l'assainissement est financé par des fonds publics. Notez que cela dépend également du pays. En effet, un écart important existe en Europe où certains pays sont responsables de l'assainissement des sites orphelins, tandis que d'autres ne supportent pas du tout leur réhabilitation.

En général, les fonds pour la gestion des sites contaminés sont à hauteur de 58% des fonds privés (figure 9).

Cependant, la contamination des sols a un coût important pour les Etats européens qui gèrent ces sites à hauteur de 42%. Si l'on ramène ceci au coût par habitant et par an, la commission européen a estimé qu'il était de 11 € en 2011, mais avec une disparité importante entre les pays faisant parti de l'étude (Figure 10).



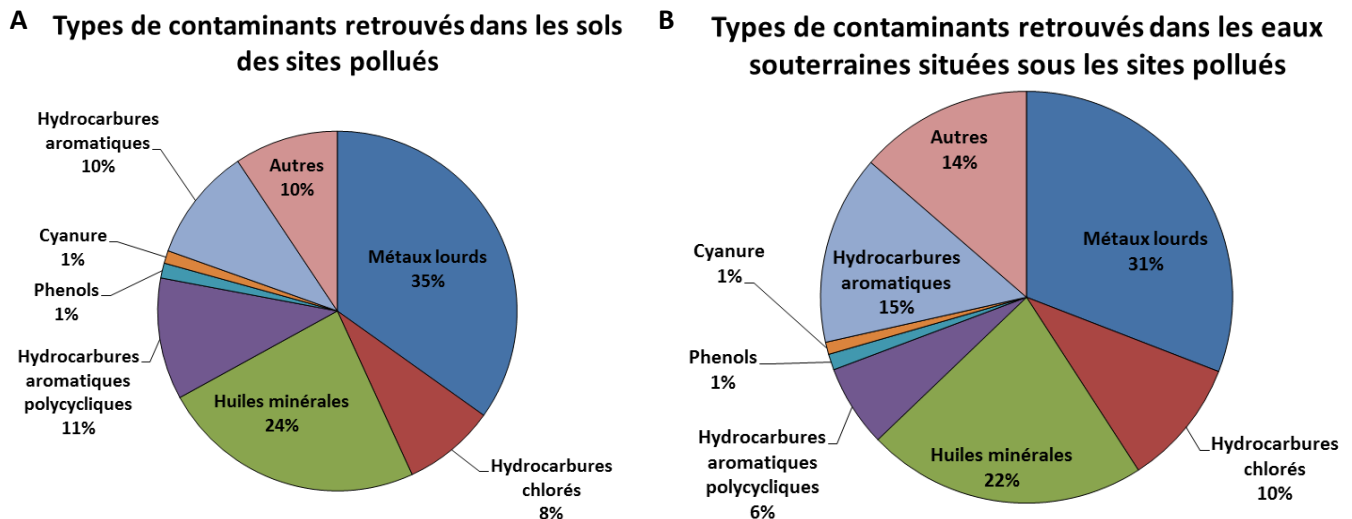
**Figure 9:** Origine des financements utilisés pour la gestion des sites contaminés. Les données sont exprimées en pourcentage. Source: AEE



**Figure 10 :** Coût en euros (€) de la gestion des sites contaminés par habitant et par an dans les différents pays européens. Source: AEE

#### 4. Les contaminants issus des sites et sols pollués

Le diagnostic des sols et des eaux souterraines des sites contaminés en Europe a permis d'identifier les principales familles de polluants présents. Pour les deux compartiments, la distribution des contaminants est similaire avec une prédominance des métaux lourds qui sont les principaux contaminants dans 35% des cas où les sols sont contaminés et 31% des cas où la contamination est identifiée au niveau des eaux souterraines. Ils sont suivis par les alcanes (C15-C40) appelés aussi huile minérale (24%), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (11%), les hydrocarbures aromatiques (10%), les hydrocarbures chlorés (8%), les phénols (1%), le cyanure (1%) et d'autres composés dans 11% des cas (Figure 11A et 11B).



**Figure 11** : Les principaux contaminants présents dans le sol (A) et les eaux souterraines (B) des sites contaminés. Source: AEE

##### 4.1. La contamination inorganique: les métaux lourds

La désignation «métaux lourds» bien qu'elle soit souvent utilisée dans la littérature n'a pas de sens et ne repose sur aucune base scientifique. En outre, les éléments inclus dans cette définition varient en fonction des auteurs (Duffus, 2002). Cette classification est d'autant plus contradictoire que dans les métaux qui sont considérés comme des «métaux lourds», certains sont essentiels pour les processus biologiques des organismes vivants tels que le cuivre (Cu), le chrome (Cr), le manganèse (Mn) ou encore le zinc (Zn) mais peuvent présenter une toxicité à forte concentration ou sous certaines formes de spéciation. A l'inverse, certains métaux lourds sont toxiques quelle que soit leur concentration tels que le cadmium (Cd), le mercure (Hg) et le plomb (Pb) (Rzymyski et al, 2015).

Les sources anthropiques de contamination des sols par les métaux lourds sont variées. Ils peuvent provenir de l'industrie (par exemple, le métallurgie ou l'industrie énergétique), les transports, les activités minières actuelles et anciennes, la gestion des déchets municipaux, les déchets des décharges ou les engrais et déchets utilisés pour fertiliser le sol (Szyzewski et al, 2009; Yao et al, 2012; Guvenc et al, 2003).

Bien que les métaux lourds soient des éléments naturellement présents dans la croûte terrestre, des concentrations élevées dans l'environnement sont principalement dues à des perturbations d'origine anthropique de leur cycle géochimique naturel. Cette augmentation de leur

concentration peut entraîner de graves effets sur la santé humaine et environnementale. Les métaux lourds ne sont pas biodégradables et ont la capacité de se bioaccumuler (Newman, 2009) dans les organismes. Ils peuvent être à l'origine de perturbations altérant les fonctions biologiques de divers organes tels que le cerveau, les poumons, les reins, le foie ou le sang et peuvent causer des maladies dégénératives de types physiques, musculaires ou neurologiques (Jaishankar et al, 2014).

#### **4.2. La contamination organique**

Pour 65% des cas de contamination des sols, celle-ci est organique. Il convient de noter que la majorité des contaminants identifiés dans les sites et sols pollués ou potentiellement pollués sont issus d'énergies fossiles tels que le charbon ou le pétrole. Voici quelques caractéristiques de ces composés.

##### **4.2.1. Les huiles minérales**

Les huiles minérales représentent un mélange obtenu par la distillation de combustibles fossiles (charbon, pétrole et schistes bitumineux). Elles sont principalement utilisées comme lubrifiants mécaniques et carburant (diesel). Les alcanes sont les principaux composés de ces huiles. Ces hydrocarbures saturés sont constitués uniquement d'atomes de carbone et d'hydrogène liés les uns aux autres par des liaisons simples qui peuvent être ramifiées ou non. Les alcanes des huiles minérales contiennent typiquement entre 15 et 40 atomes de carbone.

En raison de leurs caractéristiques physico-chimiques, les alcanes sont très peu réactifs et insolubles dans l'eau. En général, ils ont une faible toxicité et n'ont pas de propriétés cancérigènes, mutagènes ou tératogènes. Une fois dans les organismes, ils sont métabolisés soit en alcools, soit en acides gras pour les rendre plus hydrophiles et peuvent ensuite être utilisés comme source d'énergie et de carbone principalement pour les bactéries (Beilen et al., 1994; Schaeffer et coll, 1979; Poole, 1996). Parmi les alcanes les plus étudiés, le n-hexane (C6) qui est connu pour induire une neuropathie chez l'être humain (Wang et al., 1986). Sa toxicité est due principalement à son oxydation en 2,5-hexadione, qui est connu pour être un agent neurotoxique (INCHEM 1991).

##### **4.2.2. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (ou HAP)**

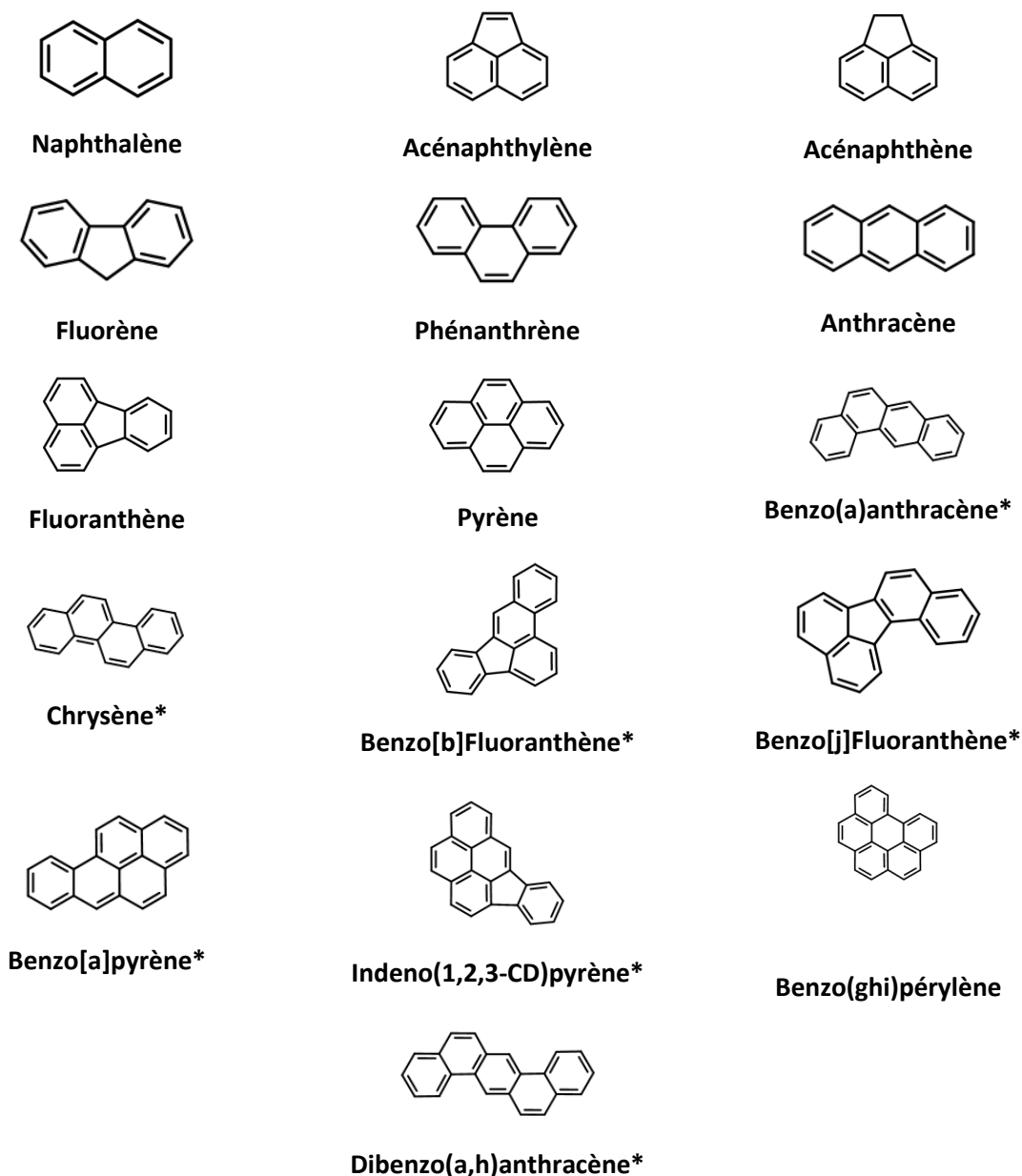
Les HAP représentent une sous-famille d'hydrocarbures composés exclusivement de carbone et d'hydrogène. Ils sont formés par la fusion de plusieurs cycles aromatiques, essentiellement benzéniques. Le naphthalène est la configuration la plus simple avec une combinaison de deux cycles. Les HAP peuvent avoir deux origines. Ils sont naturellement présents dans les produits pétroliers, ils sont alors dits HAP d'origine pétrogénique et sont souvent ramifiés avec des groupes alkyles. Les HAP peuvent également être formés par la combustion incomplète ou pyrolyse de la matière organique (incinération des déchets, la combustion du bois et du charbon, le fonctionnement des moteurs à essence ou diesel ...), ils sont alors d'origine pyrogénique et sont généralement non ramifiés.

Les propriétés des HAP dépendent de leur taille et leur structure. Cependant, ils sont tous hydrophobes et hautement lipophiles. Ils ont donc la capacité à se concentrer dans les organismes, les sols et les sédiments. Bien entendu, plus le poids moléculaire augmente, plus ces caractéristiques sont marquées.

Leurs voies d'assimilations sont cutanée, respiratoire ou orale. Le principal risque pour la santé associé aux HAP est leurs effets génotoxiques. Ils peuvent aussi avoir des effets négatifs

sur l'homéostasie globale des organismes après exposition à court ou à long terme (Unwin et al., 2006; ATSDR, 1995). Il est intéressant de noter que les HAP ont principalement leurs effets cancérigènes chez les mammifères après métabolisation oxydative générant des époxydes qui peuvent alors se lier aux protéines cellulaires et créer des adduits à l'ADN (Armstrong et al., 2004; Bach et al., 2003; Kim et al, 2013) .

Du fait de leurs effets cancérigène, mutagène et reprotoxique (CMR) et leur omniprésence dans l'environnement, l'agence de protection environnementale des États-Unis (US-EPA) a inclus 16 d'entre eux dans la liste des polluants prioritaires depuis 1976 (figure 12). Par conséquent, ils sont régulièrement contrôlés dans les évaluations environnementales.



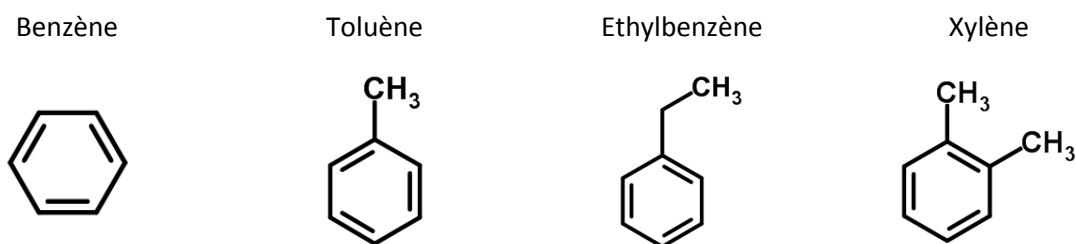
**Figure 12** : Représentation des 16 HAP prioritaires de la liste US-EPA. Les HAP reconnus comme cancérigènes sont identifiés par un astérisque.

#### 4.2.3. Les hydrocarbures aromatiques (BTEX)

Les hydrocarbures aromatiques font référence à des composés chimiques avec des structures mono-aromatiques composées d'un noyau benzénique substitué ou non. Parmi ces hydrocarbures aromatiques, 4 sont particulièrement suivis. Ce sont le benzène, le toluène, l'éthylbenzène et le (para, méta et ortho) xylène (figure 13).

Ces quatre composés chimiques sont principalement utilisés dans l'industrie pétrochimique qui les transforme pour faire d'autres composés synthétiques. Ils sont ainsi présents dans de nombreux produits tels que les vernis, les solvants, les plastiques, le cuir, le caoutchouc, les laques, les cires, et les encres. Êtant naturellement présents dans le pétrole, les principales sources d'émission de BTEX sont donc les échappements automobiles, le raffinage du pétrole, l'évaporation de l'essence pendant le stockage, le transport et la distribution.

Les effets de BTEX sur la santé sont nombreux et parfois très graves. Une exposition aiguë aux BTEX peut causer des irritations nasales, cutanées et oculaires, des maladies nerveuses et respiratoires (Wilbur et Bosch, 2004) alors que l'exposition chronique provoque des dommages aux reins, au foie et à la circulation sanguine (Agence pour les substances toxiques et les maladies, 1997, 2000, 2007a, b). En outre le benzène est classé comme cancérigène pour l'homme par l'Organisation mondiale de la santé (OMS).



**Figure 13** : Représentation des 4 BTEX

#### 4.2.4. Les hydrocarbures chlorés

Les hydrocarbures chlorés comprennent des molécules ayant des propriétés et des utilisations différentes. Ici, deux familles de composés seront présentées:

- les solvants chlorés
- Les molécules aromatiques chlorées: polychlorobiphényle (PCB), les dioxines et les furanes.

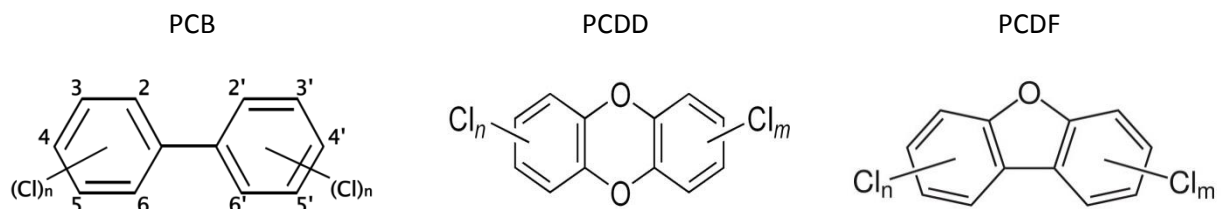
##### Les solvants chlorés (hydrocarbures chlorés aliphatiques)

Les solvants chlorés correspondent à des chaînes aliphatiques, dont certains atomes d'hydrogène ont été remplacés par des atomes de chlore. Les plus courants sont le trichloroéthylène, le dichlorométhane et le tétrachloroéthylène. Ils sont très utilisés soit comme détergents (dégraissage, nettoyage à sec) ou comme solvants dans la production chimique (par exemple, les peintures, les adhésifs, le chlorure de polyvinyle ...) (ATSDR, 1997a, b, 2000). Les effets biologiques de ces solvants sont proches de ceux des BTEX bien que la neurotoxicité soit leur principal effet sur la santé (Bale et al., 2011).

##### Les molécules chlorées aromatiques: les polychlorobiphényles (PCB), les dibenzodioxines polychlorés (PCDD) et les dibenzofuranes polychlorés (PCDF)

Ces molécules sont chimiquement très semblables et sont uniquement d'origine anthropique pour les PCB et d'origine anthropique ou naturelle pour les PCDD et PCDF. En ce qui concerne les composés d'origine anthropique, les PCB sont des produits de synthèse industrielle alors que les PCDD et les PCDF sont des impuretés générées pendant le processus de fabrication des PCB. Les PCDD et les PCDF peuvent également être générés lors de la combustion incomplète de la matière organique (par exemple de l'incinération des déchets).

Les PCB sont constitués d'un noyau biphenyle ayant jusqu'à 5 atomes de chlore par cycle (voir la figure 14). Il y a 209 congénères différents. Ils sont classés selon deux catégories, les PCB de type « dioxin like » ayant les mêmes propriétés que les PCDD et les PCB « non-dioxin like ». 12 sont considérés comme plus toxiques pour la santé (4 sont ortho : 77, 81, 126 et 169, et 8 sont non ortho : 105, 114, 118, 123, 156, 157, 167 et 189). Cependant, leur abondance est peu importante dans les mélanges industriels ou dans des matrices environnementales. Parmi les PCB, sept sont plus abondants que les autres, et représentent 80% des PCB totaux. Ces PCB sont considérés comme des « indicateurs » et sont ceux suivis dans le diagnostic de l'environnement. Il s'agit des PCB avec les numéros suivant : 28, 52, 101, 118, 138, 153 et du 180.



**Figure 14** : Structures génériques des PCB, des PCDD et des PCDF

Les PCB ont longtemps été utilisés comme isolant thermique dans les équipements électriques (transformateurs, condensateurs). Cependant, en raison de leurs effets biologiques et de leur stabilité thermique et chimique, ils ont été rapidement considérés comme des polluants organiques persistants (POP). Cela a conduit à la mise en place de réglementations au niveau national, européen et mondial pour limiter ou même interdire leur commercialisation et leur utilisation.

Que se soit les PCB, les dioxines ou les furannes, ils présentent une grande stabilité dans l'environnement. Ils sont bioaccumulables et sources de cancers ; Ils sont supprimeurs du système immunitaire, perturbateurs endocriniens et entraînent des troubles de la reproduction et du développement.

## 5. L'évaluation des risques environnementaux des sols contaminés

### 5.1. La réglementation

L'une des difficultés liée à l'étude et la gestion des sites et des sols contaminés est qu'il n'y a actuellement pas de réglementation harmonisée au niveau européen. En effet, une directive-cadre sur le sol a été proposée en 2006 pour protéger le sol contre les huit menaces qui l'affectent et qui comprennent la contamination chimique. Cependant, cette directive n'est toujours pas entrée en vigueur (stratégie thématique pour la protection des sols, 2006). Il en résulte une disparité dans la gestion des sites contaminés entre les pays de l'union européennes ainsi que ceux faisant parti du reste de l'Europe. Par exemple, le recensement des sites pollués peut être un inventaire national dans certains pays, tandis que dans d'autres

pays, la gestion des sites contaminés se fait au niveau régional. Notez que certains pays ne communiquent pas sur leurs inventaires des sites contaminés à l'agence européenne pour l'environnement (tableau 2).

**Tableau 2** : Méthode d'inventaire des sites et des sols contaminés dans différents pays européens (sources de l'EEE de données)

	Nombre de pays	Pays
<b>Inventaire central et national</b>	23	Irlande, Espagne, France, Suisse, Luxembourg, Pays-Bas, Danemark, Norvège, Finlande, Estonie, Lituanie, Lethonie, Autriche, République Tchèque, Slovaquie, Hongrie, Croatie, Roumanie, Bulgarie, Serbie, Macédoine, Albanie et Monténégro
<b>Inventaire décentralisé</b>	5	Italie, Allemagne, Belgique, Malte et Suède
<b>Pas d'information</b>	8	Portugal, Royaume-Uni, Islande, Grèce, Pologne, Slovaquie, Chypre, Bosnie-Herzégovine

Il en est le même pour la gestion des sites orphelins ou à responsabilité défectueuse. Certains états mettent en place des fonds pour permettre la remise en état de ces sites tandis que dans d'autres pays, la réhabilitation n'est pas financée, soulevant des questions sur le risque environnemental associé à ces sites contaminés (tableau 3).

**Tableau 3** : Méthode de financement pour les sites contaminés orphelins dans différents pays européens (sources de l'EEA de données)

	Nombre de pays	Pays
<b>Mécanismes de financement disponible</b>	17	Irlande, Royaume-Uni, France, Pays-Bas, Danemark, Norvège, Suède, Finlande, Estonie, Suisse, Italie, Hongrie, Autriche, République Tchèque, Slovaquie, Croatie et Chypre
<b>Mécanismes de financement au niveau régional</b>	2	Belgique et Allemagne
<b>Pas de mécanisme de financement</b>	7	Espagne, Macédoine, Monténégro, Lituanie, Malte, Luxembourg et Lethonie,
<b>Pas d'information</b>	10	Islande, Portugal, Pologne, Roumanie, Bulgarie, Serbie, Albanie, Grèce, Slovaquie, Bosnie-Herzégovine

Cette disparité affecte également les investigations pour identifier les sites contaminés. Elles sont généralement basées sur des analyses chimiques limitées à certaines molécules. Cependant, la liste des molécules et des concentrations limites prises en compte pour se prononcer sur la contamination d'un site peuvent être différentes. Par conséquent, un site considéré comme contaminé dans un pays ne le sera pas nécessairement dans un autre.

Par exemple, en France, il n'y a pas de réglementation spécifique sur le sol. Les propriétaires de sites contaminés se réfèrent au code de l'environnement et en particulier à la

réglementation des installations classées pour la protection de l'environnement (ICPE) pour la gestion de leurs sites (Code de l'environnement de la République française). Ce règlement exige que les propriétaires de sites contaminés les réhabilitent de sorte que les sites soient sans danger pour les activités futures. Toutefois, ce règlement ne fixe pas de teneurs maximales à respecter en termes de contaminants. Par conséquent, pour savoir si leurs sites sont conformes à la législation, les propriétaires se réfèrent par défaut à la législation sur les déchets et en particulier à un décret qui fixe des teneurs maximales pour certains contaminants dans le sol pour qu'ils soient admissibles dans les décharges pour déchets inertes (Ordre du 12 Décembre 2014, Journal officiel de la République française). Les molécules suivies dans les sols des sites contaminés sont ceux indiqués dans le tableau 4.

**Tableau 4** : Composés suivis dans les sols contaminés français. Source: Décret du 12 Décembre 2014, Journal officiel de la République française.

Composé	Valeur limite à respecter (En mg / kg de matière sèche)	Analyse
Arsenic	0,5	Test de lixiviation selon le standard NF EN 12457-2
Baryum	20	
Cadmium	0,04	
Total Chrome	0,5	
Cuivre	2	
Mercure	0,01	
Molybdenum	0,5	
Nickel	0,4	
Plomb	0,5	
Antimoine	0,06	
Selenium	0,1	
Zinc	4	
Chlorure	800	
Fluorure	10	
Sulfate	1000	
Indice de Phénol	1	contenu total du sol
BTEX	6	
PCB (7 congénères : 118, 138, 153, 180, 28, 52, 101)	1	
Hydrocarbures (C10 à C40)	500	
HAP (16 HAP de la liste de l'US EPA)	50	

Il est intéressant de noter que dans les autres pays européens, le diagnostic environnemental des sols contaminés peut varier malgré des bases communes. Par exemple, l'Allemagne et la Suisse ont des diagnostics qui diffèrent de celui de la France. La contamination du sol en Allemagne est régie par la loi fédérale de protection des sols et une ordonnance associée qui fixe des teneurs maximales pour certains contaminants dans les sols et les eaux souterraines des sites contaminés (Loi sur la protection des sols fédéral, 1998; la protection des sols fédéral et des sites contaminés Ordonnance 1999). Cependant les contaminants surveillés ne sont pas les mêmes que ceux suivis en France et les concentrations acceptables dépendent des activités humaines soutenues par ces sites (voir les tableaux 5 et 6).



**Tableau 5** : Somme des équivalents toxiques avec comme molécule de référence la 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzodioxine- impliquant une action de décontamination. Les facteurs équivalents toxiques proviennent de l'OTAN/CCMS. Source: Protection fédérale des sols contaminés et ordonnance sur les sites (Allemagne).

<b>Valeurs maximales autorisées (ng- TCDD EQ / kg de poids sec)</b>				
<b>Composés</b>	<b>Aires de jeux</b>	<b>Zones résidentielles</b>	<b>Parcs et installations récréatives</b>	<b>Zones Industrielles et commerciales</b>
<b>Dioxines/Furanes (PCDD/F)</b>	100	1000	1000	10000

**Tableau 6** : Valeurs de référence nécessitant une action de décontamination selon le droit allemand. Source: Protection fédérale des sols contaminés et ordonnance sur les sites.

<b>Valeurs maximales autorisées (mg/kg de poids sec)</b>				
<b>Composé</b>	<b>Aires de jeux</b>	<b>Zones résidentielles</b>	<b>Parcs et installations récréatives</b>	<b>Zones industrielles et commerciales</b>
<b>Arsenic</b>	25	50	125	140
<b>Plomb</b>	200	400	1000	2000
<b>Cadmium</b>	10	20	50	60
<b>Cyanure</b>	50	50	50	100
<b>Chrome</b>	200	400	1000	1000
<b>Nickel</b>	70	140	350	900
<b>Mercure</b>	10	20	50	80
<b>Aldrin</b>	2	4	10	--
<b>Benzo(a)pyrene</b>	2	4	10	12
<b>DDT</b>	40	80	200	--
<b>Hexachlorobenzene</b>	4	8	20	200
<b>Hexachlorocyclohexane (HCH-mix or <math>\beta</math>-HCH)</b>	5	10	25	400
<b>Pentachlorophenol</b>	50	100	250	250
<b>PCB (28, 52, 101, 138, 153 et 180)</b>	0,4	0,8	2	40

Le système suisse est similaire au système allemand où les concentrations exigeant des valeurs d'assainissement, dépendent également de l'activité future du site. La gestion des sites contaminés est dans l'ordonnance du 26 Août 1998 relative à l'assainissement des sites pollués. La Suisse suit, pour ses sites pollués, la teneur en composés dans l'eau (essai de lixiviation), dans l'air interstitiel et le sol lui-même. Les molécules suivies ne sont pas nécessairement les mêmes selon le compartiment et l'autorité suisse peut, dans des cas individuels, établir des valeurs de référence pour les molécules ne faisant pas partie de la liste prédéfinie. Les composés suivis en permanence sont présentés dans le tableau 7.

**Tableau 7** : Valeurs de référence dans le sol nécessitant une action de décontamination selon le droit Suisse. Source: Ordonnance sur l'assainissement des sites pollués.

Valeurs maximales autorisées dans les sols (mg/kg de poids sec)		
Composé	utiliser à des fins agricoles ou horticoles	Aires de jeux, zones résidentielles, parcs et installations récréatives
<i>Composés inorganiques</i>		
Antimoine	--	50
Arsenic	--	50
Plomb	2000	1000
Cadmium	30	20
Chrome	--	100
Cuivre	1000	1000
Nickel	--	1000
Mercure	--	2
Argent	--	500
Zinc	2000	2000
<i>Composés organiques</i>		
hydrocarbures chlorés volatils (7 congénères)	--	1
PCB (28, 52, 101, 138, 153 and 180)	3	1
Hydrocarbures C5 à C10	--	5
Hydrocarbures C11 à C40	--	500
BTEX	--	500
Benzène	--	1
HAP (16 HAP de la liste de l'US EPA)	100	100
Benzo(a)pyrene	10	10

Comme indiqué dans ces trois exemples, le diagnostic des sols contaminés est très hétérogène entre les différents pays européens. Les pays membres de l'Union européenne ont également des lois différentes. Cela remet en question la désignation des sites potentiellement contaminés et contaminés donnée par l'agence européenne pour l'environnement. L'harmonisation des règlements serait une première étape vers l'amélioration de l'analyse environnementale des sols contaminés. Cependant, il ne s'agit pas là de la seule limite dans les investigations de la contamination des sols et sites contaminés.

## 5.2. Complexité de la contamination chimique

Comme cela a été vu ci-dessus, les diagnostics sur l'état de contamination des sites pollués sont basés sur une courte liste de composés (voir les exemples de la France, l'Allemagne et la Suisse). Mais ces sites sont généralement contaminés par des mélanges complexes, tels que des produits pétroliers ou issus du charbon qui peuvent contenir des centaines voire des milliers de composés. Un exemple est la créosote, qui est un produit de distillation du goudron utilisé comme biocide et conservateur du bois extérieur. Il est principalement composé de HAP qui peuvent représenter 80% de sa masse. Toutefois, ce type de mélange peut contenir jusqu'à 10.000 composés différents (Sundstrom et al., 1986). La toxicité d'une contamination n'est pas nécessairement due aux composés les plus abondants, mais dépend aussi des propriétés intrinsèques de chaque molécule. Ainsi, un composé très peu concentré dans le mélange de départ peut présenter un risque environnemental important en raison de sa

toxicité. La créosote est un exemple parfait pour illustrer la contamination complexe. Hartnik et al. (2007) ont étudié les eaux souterraines contaminées avec ce mélange. Leur étude a porté sur l'effet toxique en utilisant le Microtox® (un essai de toxicité aiguë sur la bactérie marine *Vibrio Fisherii*). Leur étude a montré grâce à un fractionnement que les HAP et les composés aromatiques polycycliques possédant du soufre et de l'oxygène, bien qu'étant les composés majoritaires de la créosote étaient seulement responsables de 13% de la toxicité observée. Les effets biologiques observés lors de cette étude étaient dus à d'autres composés tels que des phénols ou des composés aromatiques polycycliques (PAC), tels que des quinoléines. L'autre difficulté dans le diagnostic d'une contamination par des mélanges organiques est la possible évolution des composés du mélange d'origine. En effet, une fois que le contaminant se retrouve dans le sol et de manière générale dans l'environnement, il entre en interaction avec les éléments abiotiques et biotiques. Cela se traduit par une évolution possible de celui-ci telle que la formation de nouvelles molécules et des réactions chimiques conduisant à la formation de produits de dégradation possédant des propriétés chimiques et/ou biologiques radicalement différentes. Encore une fois les HAP sont un bon exemple de l'évolution des composés organiques dans le sol. Ils ont la possibilité de se transformer en oxy-HAP par le biais des oxydations biologiques ou chimiques (Cerniglia 1992; Kochany et Maguire, 1994; Yu, 2002). Les Oxy-HAP sont des HAP sur lesquels sont greffées une ou plusieurs cétones ou des groupements alcool. Par conséquent, les Oxy-HAP peuvent se former naturellement dans le sol ou lors des étapes d'assainissement du sol si une oxydation incomplète des HAP se produit (Lundstedt, et al., 2006). En raison de leur oxydation et donc de leur plus grande polarité, ces molécules sont potentiellement plus mobiles que les HAP et ont la possibilité de migrer vers d'autres compartiments de l'environnement (Wischmann et Steinhart, 1997 ; Meyer et al, 1999 ; Yu, 2002). Ces produits de dégradation ont également montré leur capacité à induire des effets mutagènes et génotoxiques (Pitt et al., 1982 ; Alsberg et al, 1985 ; Moller et al, 1985; Fernandez et al., 1992) et à affecter divers organismes dans l'environnement (Lundstedt et al., 2007).

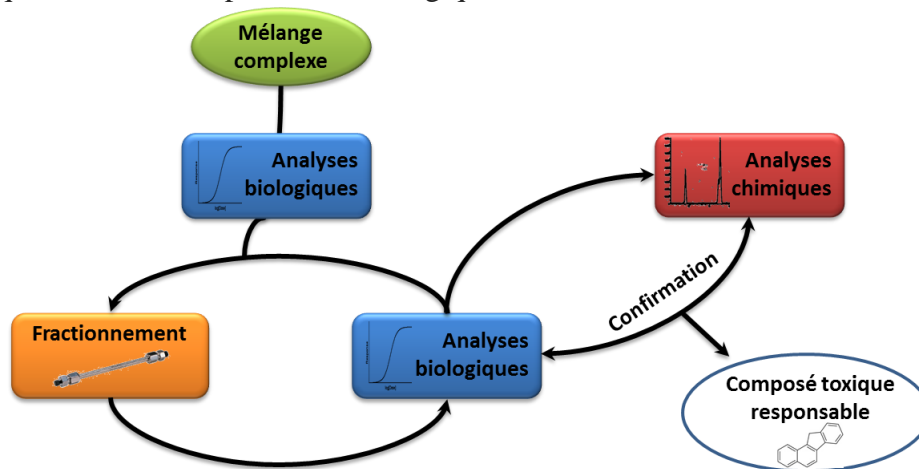
Par conséquent, ces diagnostics limités sont de plus en plus remis en question. Achten et Andersson (2015) ont récemment écrit un article expliquant pourquoi la liste des 16 HAP de la liste US EPA est obsolète. Il faut comprendre que les listes de molécules suivies ont été créées au cours du siècle dernier (1976 pour 16 HAP de la liste EPA des États-Unis; 1982 pour les 7 PCB de référence sélectionné par le Bureau communautaire de référence de la Commission européenne). Mais les techniques d'analyse et la connaissance de la toxicologie ont évolué, il serait intéressant de mettre à jour les listes des molécules suivies par la prise en compte des contaminants «inconnus» présents dans les mélanges initiaux et des produits de dégradation des molécules parentes. Cela permettrait d'améliorer le diagnostic des sols contaminés et d'améliorer ainsi la gestion de ces sites à risque pour la santé humaine et l'environnement afin d'assurer un niveau optimal de protection.

Cependant, une question demeure. Comment trouver des molécules d'intérêt à intégrer dans les diagnostics environnementaux? Comme mentionné ci-dessus, la contamination des sols est le résultat de mélanges complexes qui peuvent évoluer. Il est donc nécessaire de développer des méthodes pour simplifier ces mélanges et pour identifier des molécules présentant des effets biologiques. Une solution est l'utilisation de la bio-analyse et plus particulièrement de l'analyse dirigée par l'effet (EDA : Effect Directed Analysis).

## **V. La Bio-analyse: lien entre les contaminants et les effets biologiques**

La bioanalyse correspond à un sous-champ de la chimie analytique qui associe une activité biologique à un composé ou un groupe de composés spécifiques. Elle vise à fournir des

mesures quantitatives de la toxicocinétique, la pharmacocinétique, la bioéquivalence et/ou la dose-réponse d'un composé (Booth, 2009; Hill, 2009). En ce qui concerne l'étude des contaminants, la bioanalyse a pour but de découvrir si ce contaminant est responsable des effets toxiques dans un compartiment écologique.



**Figure 15** : Illustration de l'analyse dirigée par l'effet. Inspiré de Brack. 2003.

Une approche impliquant de la bioanalyse et permettant de faire le lien entre un composé et des effets biologiques dans un environnement naturel est l'analyse dirigée par l'effet (ou effect directed analysis en anglais, EDA). Cette approche a été très bien expliquée par Brack (2003). Elle consiste à identifier des molécules organiques responsables d'effets biologiques dans les matrices environnementales (par exemple: perturbation du système endocrinien) en associant du fractionnement physico-chimique, des biotests et de la chimie analytique (Figure 15). L'approche consiste, après l'extraction des composés de la matrice, à effectuer des essais biologiques sur l'extrait environnemental afin d'identifier une réponse biologique qui peut impliquer soit des récepteurs spécifiques (ER, AhR, AR) ou des organismes entiers pour les tests de toxicité aiguë (Microtox ...). Toutefois, l'analyse de l'extrait en soi ne permet pas l'identification de molécules, en particulier si la contamination est complexe. Par conséquent, l'EDA comprend une étape de fractionnement pour simplifier l'extrait en séparant les composés les uns des autres en fonction de leurs propriétés physico-chimiques (par exemple la polarité). Une fois cette séparation effectuée, les différentes fractions sont analysées avec les mêmes bioessais ayant répondu précédemment pour l'extrait brut afin de trouver celles qui contiennent les composés actifs. Les fractions répondant positivement aux tests biologiques contiennent des molécules ayant les activités biologiques observées, ces fractions sont ainsi analysées chimiquement en vue d'identifier les molécules responsables des effets mesurés. En dépit de la simplification de l'échantillon, une fraction peut contenir plusieurs molécules. Il est donc important de vérifier que les composés analysés sont responsables de l'activité observée. Pour cela, après identification, il est nécessaire de passer par une étape de confirmation finale en testant la molécule seule pour vérifier sa réponse biologique et de l'analyser chimiquement afin de s'assurer qu'aucune erreur n'a eu lieu lors de l'identification chimique.

L'EDA a été appliquée à plusieurs reprises sur les matrices des milieux aquatiques pour identifier des composés biologiquement actifs. Le tableau 8 comprend un ensemble d'études EDA ainsi que des composés et/ou familles de composés identifiés dans ces analyses.

**Tableau 8** : Différentes études avec l'approche EDA. Les colonnes présentent la matrice étudiée, la méthode d'extraction des contaminants, le fractionnement et le type d'analyses biologiques.

Matrice	Méthode d'extraction	Méthode de fractionnement	Bioessais	Lignée cellulaire/ Organisme	Méthode d'indentification chimique	Polluants mis en présence	Source
Sédiment	Ultrason (DCM puis méthanol)	microcolonne NP-HPLC (Hex/DCM)	Ames	Salmonella typhimurium	GC/MS	HAP	Marvin et al. 1994
Sédiment	Ultrason (DCM puis méthanol)	NP-HPLC (n-hexane, DCM et ACN) RP-HPLC(1 : eau/ACN ; 2 ACN/DCM)	Ames	Salmonella typhimurium	GC/MS	HAP	Marvin et al. 1999
Eau	SPE	RP-HPLC	Microtox	Vibrio fisheri	GC-MS	benzothiazoles et des composés organiques polaires	Reemtsma et al. 1999
Sédiment	Soxhlet (DCM puis méthanol)	NP-HPLC (Hex/DCM/ACN)	Ames	S Typhimurium	Non déterminé	HAP	Marvin et al. 2000
Eau	SPE	RP-HPLC (C18) µL-HPLC	Microtox	Vibrio fisheri	GC/MS	Pesticides et composés pharmaceutiques	Reineke et al. 2002
Sédiment	ASE (DCM:Acetone ; 3:1)	RP-HPLC et NP- HPLC	ER et DR- Calux	H4IIE T47D	GC-ITD GC-MSD GCxGC-ToF-MS	HAP	Houtman et al. 2006
Eau	SPE	RP-HPLC (C18) methanol: Water	EROD Induction de la production de vitéllogénine	hépatocytes de truite arc-en-ciel	GC/MS LC-MS/MS	17B-estradiol, Estriol, alkylphenols, benzophenone et methylparabene HAP, HAP alkylés , Nitro-CAP, carbazoles	Grung et al. 2007
Eaux souterraines	Extraction liquide	NP-HPLC	Microtox	Vibrio fisheri	GC/MS	Quinoline, phenols	Hartnik et al. 2007
Sédiment	ASE	NP-HPLC	EROD MTT	H4IIE	GC/MS (Targeted analysis)	HAP et HAP alkylés	Kaisarevic et al. 2009

Eau	Extraction liquide (DCM avec différents niveaux d'acidité)	Extraction liquide séquentielle, acide-basique + gel de silice	ER	MCF7-BUS	GC-MS	Composés phénoliques	Oh et al. 2009
Eau	SPE	RP-HPLC	Phytotoxicité	S. vacuolatus	GC/MS	Produits de dégradation du diclofenac	Schulze et al. 2010
Matière en suspension	Soxhlet (DCM)	Microcolonne NP-HPLC	EROD	RTL-W1	GC/MS	HAP	Wölz et al. 2010
Sédiment	ASE (DCM:ACN ; 3:1)	NP-HPLC	Test de contact AR-Calux ER Luc	P. antipodarum	GC/MS	ND	Schmitt et al. 2011
Sédiment	ASE (MeOH :DCM ;1 :1)	SPE et RP-HPLC	ER PXR	MELN	GC/MS	di-iso-octylphthalate 2,4-di-tert-butylphenol 2,6-di-tert-butyl- $\alpha$ -methoxy-p-cresol	Creusot et al. 2013
Sédiment	ASE Extraction séquentielle : - 3% d'acetone dans de l'hexane - 0,02% de TFA dans de l'acetone avec un pH=2 -Methanol	ASE et NP-HPLC	MTT EROD	PLHC-1	GC/MS	HAP Anti-inflammatoires non stéroïdien musc polycyclique fragrances Pesticides	Regueiro et al. 2013
Sédiment	ASE Acetone/DCM (35/65; V/V) 10g (5 fois)	NP-HPLC (n-hexane, DCM et ACN)	tg(cyp19a1b-GFP)	Poisson zèbre	GC/MS	xenoeostrogenes alkylphenols estrone	Fetter et al. 2014
Eau	Pocis (Oasis HLB) DCM/Hex/EtAc 1:1:1 v/v) + Methanol (100%)	RP-HPLC	Activité anti-androgénique	Levures	GC/MS LC-Q/ToF/MS	Fongicides, germaticides, retardateurs de flammes et des composés pharmaceutiques	Liscio et al. 2014

Bien que cette approche ait révélé son utilité dans l'analyse des composés ayant des effets biologiques dans des matrices aquatiques, elle n'est pas ou peu appliquée sur les sols. Actuellement, seules deux études portent sur l'utilisation de cette approche pour l'analyse de la contamination des sols:

- Legler et al (2011) ont appliqué une approche EDA à un sol d'une ancienne décharge municipale. Les contaminants ont été extraits par une extraction liquide sous pression en utilisant du dichlorométhane et de l'acétonitrile (v: v, 50: 50). Les contaminants ont ensuite été séparés par chromatographie en phase liquide à haute performance en mode inverse (C18) et les fractions testées pour leur embryotoxicité en utilisant le poisson zèbre comme modèle. Les fractions positives ont ensuite été analysées par GC-MS. Leur étude a permis d'identifier de nouveaux composés toxiques pour le développement du poisson zèbre comme le 11H-benzo[b]fluorène, la 9-méthylacridine, le 4 et 2-azapyrène phénylquinoléine. Ces molécules ne sont actuellement pas incluses dans les diagnostics environnementaux.

- La deuxième étude a été menée par Wincent et al (2015) sur une usine à gaz, un ancien site préservant de bois et un four à coke. L'extraction a été réalisée par extraction liquide sous pression à l'aide d'hexane et d'acétone (v: v, 50: 50). Trois fractions ont été effectuées en utilisant une colonne de gel de silice. Les fractions contenaient des chaînes aliphatiques (première fraction), des HAP (seconde fraction) et des Oxy-HAP (troisième fraction). Les extraits et les fractions ont été testés pour leur activation de la voie Aryl hydrocarbure (Ah) et leur toxicité sur le développement du poisson zèbre. Tous les extraits ont montré leur capacité à induire la production ARNm régulés par le récepteur Ah ainsi que des difformités et une augmentation de la mortalité des poissons. Cette étude a démontré que les Oxy-HAP tout comme les HAP sont capables d'induire une réponse activatrice du récepteur Ah et une toxicité pour le développement chez le poisson zèbre.

Toutes ces études démontrent la puissance du processus EDA pour hiérarchiser les polluants émergents qui ne sont pas encore inclus dans les diagnostics environnementaux.

## **VI. Conclusion**

Les sols sont d'une importance capitale pour notre société. Cependant, ils subissent de nombreuses pressions qui affectent leur fonctionnement. L'une d'elles est la contamination chimique due à l'activité anthropique. À l'heure actuelle, il n'y a pas de législation européenne spécifique sur la contamination des sols contrairement à l'eau (directive cadre sur l'eau). Par conséquent, les industriels propriétaires de sites contaminés doivent se référer à des règlements qui peuvent être très variables selon les pays. Cela se traduit par un échec dans l'évaluation des risques environnementaux des sols contaminés par des mélanges complexes en raison de la faible proportion de molécules considérées. Ces molécules ne sont pas nécessairement les plus pertinentes pour expliquer la toxicité de ces sols. Voilà pourquoi il est nécessaire de développer de nouvelles approches permettant de mieux identifier les molécules ayant des effets toxiques dans le sol et d'améliorer le diagnostic environnemental de ces sols.

La bioanalyse et plus particulièrement l'analyse dirigée par l'effet ont montré leur potentiel pour identifier les polluants émergents qui ont un impact dans le milieu aquatique. Toutefois, cette approche est peu utilisée pour l'identification des polluants dans les sols. Par conséquent, le développement de ce type d'analyses pour étudier les sols contaminés est intéressant car cela permettrait de mieux comprendre la contamination des sites industriels et une meilleure gestion des risques environnementaux liés à ces sites.

C'est dans ce contexte que s'inscrivent ces travaux de thèses qui consistent à développer une approche d'analyse dirigée par l'effet sur les matrices « solides » afin de permettre l'identification de molécules organiques retrouvées au sein de mélanges complexes et présentant des effets biologiques. Au final, le but de ce travail est d'améliorer l'évaluation du risque lié à la contamination de composés organiques des sols.

Cette démarche doit respecter certains critères pour son application :

- La méthode doit être généralisable. Son application doit pouvoir fonctionner quel que soit le type de sol ou de boue étudiés.
- Les résultats doivent être robustes. Ceci implique que les méthodes de traitement des échantillons, de fractionnement et de bioessais doivent permettre d'obtenir des résultats peu variables.
- Les méthodes doivent également être simples, facilement applicables et rapides afin d'identifier au mieux les contaminants inconnus et les incorporer dans les diagnostics pré-existants.
- Le coût a aussi son importance. Cependant il reste très difficile à évaluer et est très dépendant de l'étude. En effet, comme cela a été vu dans la synthèse bibliographique, le coût d'évaluation de contamination environnemental d'un site industriel peut être très variable avec une fourchette de prix comprise entre 5000-50 000€.

Cette étude comprend le développement d'une démarche d'analyse dirigée par l'effet. Cependant, il serait peu intéressant d'appliquer celle-ci à l'ensemble des sols d'un site industriel. La première raison est que dans la majorité des cas, les sols d'un même site sont contaminés par le même mélange. La différence de toxicité entre les sols d'un site est due à une concentration plus ou moins importante des contaminants dans les sols. En effet, les contaminations du sol sont généralement le résultat de sources ponctuelles (cuve qui fuit, zone d'imprégnation...) entraînant une diminution de la contamination lors de l'éloignement de la source. L'application de la démarche EDA entraînerait une redondance dans les résultats. C'est pourquoi, l'un des objectifs de ce travail consiste également à effectuer un criblage sur l'ensemble des sols échantillonnés d'un site afin d'identifier le ou les sol(s) les plus pertinents pour la mise en place de l'analyse dirigée par l'effet.



## **II. Méthodologie**

## I. Les sites d'étude et l'échantillonnage

Afin de réaliser l'étude « EDA », deux sites ateliers ont été fournis par les membres de la fondation Innovasol. Ces sites ont été sélectionnés du fait de leur contamination par des mélanges organiques complexes. De même, une boue de station d'épuration urbaine a été utilisée car elles peuvent être utilisées comme amendement pour les sols industriels ou agricoles et être à l'origine d'une contamination organique de ces sols.

En ce qui concerne les sites industriels, leurs caractéristiques sont recensées sur la base de données BASOL qui est gérée par le Ministère de l'Écologie, du Développement Durable et de l'Énergie (MEDDE) (<http://basol.developpement-durable.gouv.fr>). Elle permet d'identifier les sites et sols pollués (ou potentiellement pollués) pouvant nécessiter des actions préventives ou curatives des pouvoirs publics. Il est également possible de consulter la base de données BASIAS qui recense les anciens sites industriels par communes (<http://basias.brgm.fr>).

Il existe également une base de données gouvernementale qui recense les stations d'épurations et informe sur leurs caractéristiques. De plus, le devenir des boues d'épuration y est également renseigné (<http://assainissement.developpement-durable.gouv.fr>).

Les caractéristiques des sites ateliers et de la station d'épuration dont est issue la boue utilisée pour développer la méthode sont développés ci-dessous.

*Remarque : Dans un souci de confidentialité, la localisation GPS des sites industriels n'est pas précisée.*

### 1. Premier site d'étude : Centrale de traitement de bois par la créosote

#### 1.1. Rappels sur la créosote de goudron de houille

La créosote est un liquide noir ou ambré, malodorant, épais et huileux qui a été découvert dans les années 30 par le chimiste allemand Karl Von Reichenbach. Il s'agit d'un mélange complexe issu de la distillation dans des fours à coke de goudron de houille.

Elle a été longtemps utilisée comme biocide et conservateur du bois, principalement pour les poteaux téléphoniques, les traverses de chemin de fer ou les bois immergés. Ce produit tire ses propriétés des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dont il est principalement composé. En effet, il s'agit d'un mélange organique complexe pouvant contenir plus de 10 000 composés mais dont les HAP représentent 80% de sa masse (Sundström et al., 1986). Les principaux constituants de la créosote sont le phénanthrène (21%), le fluoranthène (10%), le fluorène (10%), l'acénaphthène (9%), le pyrène (8.5%), le dibenzofurane (5%), les naphthalènes (le composé parent et ses dérivés méthylés: 5%), le chrysène (3%) et le carbazole (2%). Cependant d'autres familles de composés sont très bien représentées dans ce mélange comme les phénols (10%) et les composés aromatiques polycycliques (CAP) contenant des N-, S-, O-hétérocycles (3-13%) (Sundström et al., 1986 ; Dyreborg et al., 1997).

Du fait de ses effets cancérigènes, mutagènes et reprotoxiques (CMR ; ATSDR, 2002), son utilisation s'est considérablement réduite. Ainsi, l'Union européenne a mis en place deux directives afin d'interdire la vente de bois traités à la créosote (Directive 2001/90/CE de la commission du 26 octobre 2001) et de réduire la vente de créosote qu'à certains utilisateurs professionnels (Directive 76/769/CEE du 27 juillet 1976). Ainsi l'utilisation professionnelle de la créosote est de nos jours très réglementée, elle peut être utilisée pour le traitement du

bois uniquement si la concentration de benzo[a]pyrène est inférieure à 0,005 % en poids et si la concentration de phénols extractibles par l'eau est inférieure à 3 % en poids. De plus, le bois traité ne peut être utilisé que dans des cas très spécifiques (Figure 16).



**Figure 16** : La créosote de goudron de houille est utilisée pour traiter des bois extérieurs aux usages variables. Les bois traités par ce produit sont les traverses de chemin de fer, les bois des installations portuaires ou des voies fluviales, les poteaux électriques ou téléphoniques ainsi que les bois utilisés dans l'agriculture comme ceux des clôtures ou les échelas.

### **1.2. Informations sur le site d'après la base de données gouvernementale Basol**

Le site d'étude est un établissement de traitement de traverses de chemin de fer par créosotage sous vide, créé au début des années 1900 dans l'enceinte d'une gare et qui est toujours en activité. Trois zones distinctes ont été répertoriées :

- Une zone de stockage et d'emploi de créosote, de stockage de produits (traverses) ou déchets créosotés (8 sources potentielles).
- Une station-service et huilerie (2 sources potentielles).
- Une zone de stockage de fuel lourd (1 source potentielle).

Le site se situe au-dessus d'une nappe d'eau souterraine en contact avec les sols du site et ayant différents usages tels que l'alimentation en eaux potable (AEP) des populations avoisinantes et l'utilisation pour des usages industriels ou domestiques (ex : arrosage de jardins). Deux rivières ont leurs cours à proximité en relation avec la nappe d'eau souterraine. Ces rivières présentent des usages ludiques (pêche et activité de loisir) et agricoles (irrigation).

Du fait de son activité et de sa localisation ce site présente un risque potentiel pour la population et l'environnement. C'est pourquoi une étude de contamination du site a été réalisée par l'exploitant à la demande de la Direction Régionale de l'Industrie de la Recherche et de l'Environnement (DRIRE) en 2002. Cette étude a permis de mettre en avant la présence, dans les sols et la nappe sous-jacente du site, de HAP et d'hydrocarbures résultant de l'activité actuelle du site. Cependant la contamination des eaux ne dépassant pas les valeurs

de constat d'impact (VCI) dans la nappe, ce site doit seulement faire l'objet d'une surveillance semestrielle des eaux souterraines sur les hydrocarbures totaux, les HAP et l'indice phénol.

Les suivis environnementaux au cours du temps ont montré une amélioration générale du niveau de contamination avec une diminution de la teneur des composés suivis dans la nappe d'eau souterraine.

### 1.3. Plan du site et échantillonnage

Un plan de prélèvement a été élaboré par la fondation Innovasol après une étude documentaire (Interprétation de l'Etat des Milieux - Rapport BG, janvier 2010) et une visite préparatoire sur site (25 mai 2012). Les prélèvements ont été réalisés le 25 juin 2012 en différents points du site dont la localisation est présentée en Figure 17.

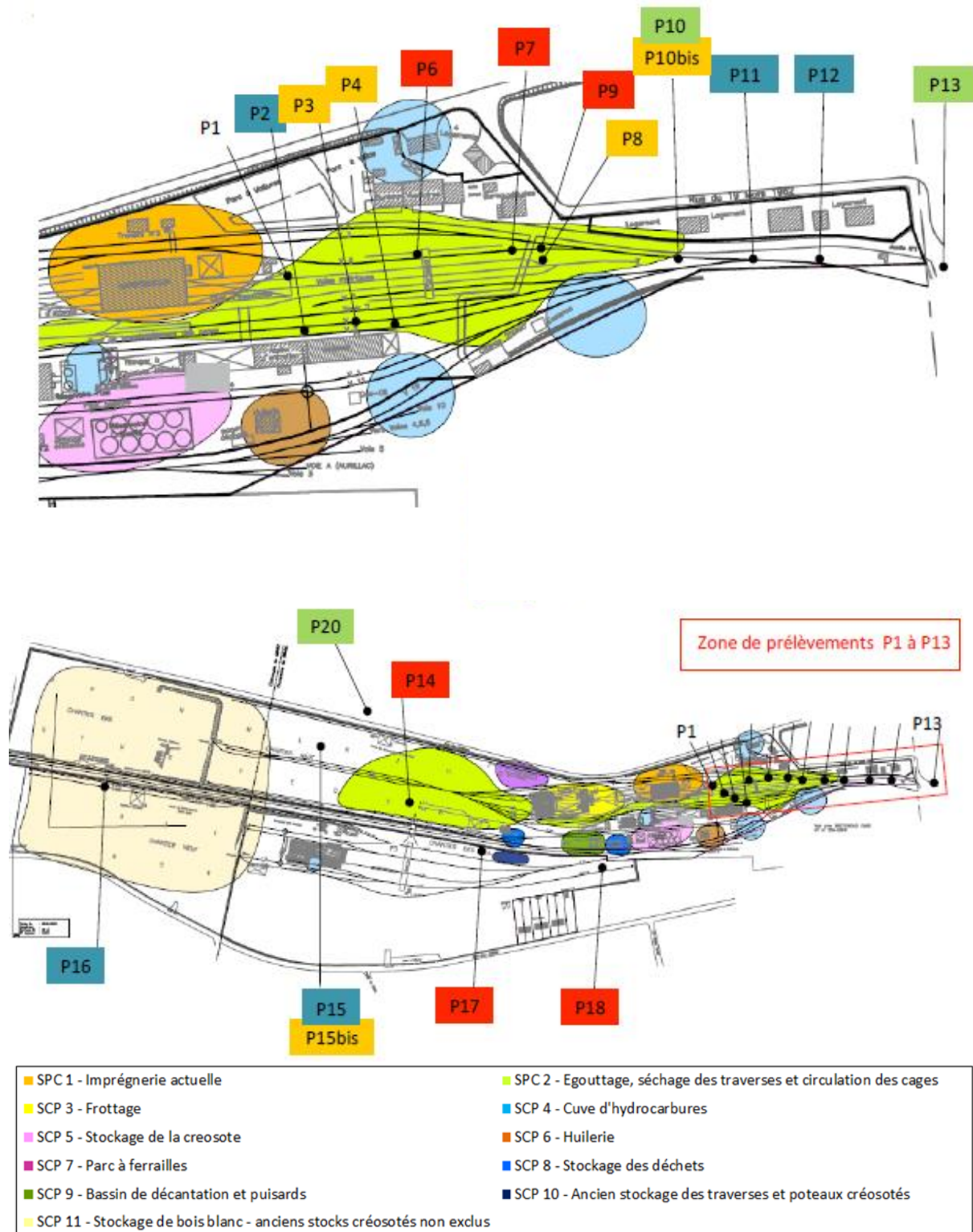
L'échantillonnage a été réalisé comme suit :

- 13 prélèvements selon une ligne brisée allant de la sortie d'imprégnation à l'entrée 1 du site pour couvrir des concentrations décroissantes en créosote,
- 1 prélèvement sur des zones de stockage récent (après 1996) de traverses imprégnées,
- 3 prélèvements sur des zones de stockage des traverses non traitées,
- 2 prélèvements localisés sur des endroits qui n'ont pas eu de contact direct avec la créosote mais sont constitués d'importants et anciens remblais de mâchefers,
- 2 prélèvements témoins considérés comme non contaminés en bordure extérieure du site,

Les principales caractéristiques des points de prélèvements sont données dans le Tableau 9.

**Tableau 9** : Nom des échantillons de sols avec leur localisation et les premières observations de terrain

Sols	Localisation	Contamination estimée	Végétation observée
P7, P9	zone d'égouttage entre les rails	Très chargé en créosote	Non
P6, P14	à proximité des traverses a égoutter	Tache récentes de créosote	Non
P3	à proximité des traverses a égoutter, entre les rails	Créosote récente	Non
P2, P4	à proximité des traverses a égoutter, entre les voies	Niveau de contamination incertain	Quelques plantes
P8, P10, P10bis P11, P12	à coté des voies	Niveau de contamination supposé faible	Quelques plantes
P15, P16, P15bis	stockage du bois non traité	Niveau de contamination supposé faible	Quelques plantes
P17, P18	zone sans activité récente	Pas de créosote mais remblais de mâchefers	Rare
P13	friche en sortie du site	Témoin non contaminé	Abondante
P20	Prairie proche du site	Témoin non contaminé	Abondante



**Figure 17** : Plan du site avec identification des différentes zones d'activités et localisation des points de prélèvement.

Pour chaque point, une trentaine de kilos de sol ont été prélevés à la pelle, tamisés sur place à 1 cm puis conditionnés en bidon de transport. Le lendemain, ils ont été étalés en extérieur et séchés pendant 3 jours. Après réception au laboratoire, ils ont été broyés et tamisés à 2mm, ils ont ensuite été stockés dans des pots ambrés dans le noir à température ambiante jusqu'à leur utilisation.

## **2. Deuxième site d'étude : Usine de traitement de gaz**

### **2.1. Informations sur le site d'après la base de données gouvernementale Basol**

Il s'agit d'une plate-forme industrielle d'une surface de 220 hectares environ qui traite et transforme le gaz de gisements avoisinants. Il se situe le long d'une rivière à une vingtaine de kilomètres d'une ville de taille moyenne (80 000 habitants). L'activité industrielle a démarré en 1957, après la découverte de pétrole puis de gaz en 1949/1951.

Il est encadré au Nord par une voie ferrée et une route et au Sud, par une voie privée et la rivière citée plus haut. Cette rivière est localisée à 250 m de l'extrémité Sud du site. Bien que la rivière soit proche, le site est considéré en zone non inondable. Ce site est isolé de la population, les zones d'habitation les plus proches sont situés à 500m.

Les activités exercées sur ce site ayant pu être à l'origine de pollution potentielle du sol et du sous-sol, un diagnostic initial et une évaluation simplifiée des risques du site ont été réalisés en 1998. Ces études ont indiqué que des investigations complémentaires étaient nécessaires pour les eaux souterraines et superficielles en ce qui concerne les polluants traceurs (hydrocarbures et benzène).

En ce qui concerne les polluants inorganique présents (Plomb, Nickel et Soufre), leur impact est constaté sur la nappe, sur le site et à l'aval du site, ainsi que sur les eaux superficielles.

En 2008 et 2010, des diagnostics ont été de nouveau effectués, ils ont montré :

- la présence de deux zones impactées par des hydrocarbures (max 46 000 mg/kg), avec présence de Benzène (max 380 mg/kg)
- un spot contaminé aux HAP (5180 mg/kg)
- une zone impactée par des métaux lixiviables : Zinc (max 38 mg/kg), Pomb (max 1000 mg/kg) et Cuivre (max 530 mg/kg)
- un spot de Mercure stable, non volatil (max 58 mg/kg)

Les zones présentant des valeurs anormales touchent 4 secteurs distincts qui ont fait l'objet de travaux de dépollution en avril et mai 2010. Ces travaux ont été menés suivants 3 étapes :

- extraction des terres polluées
- réalisation d'analyses libératoires
- remblaiement des fouilles.

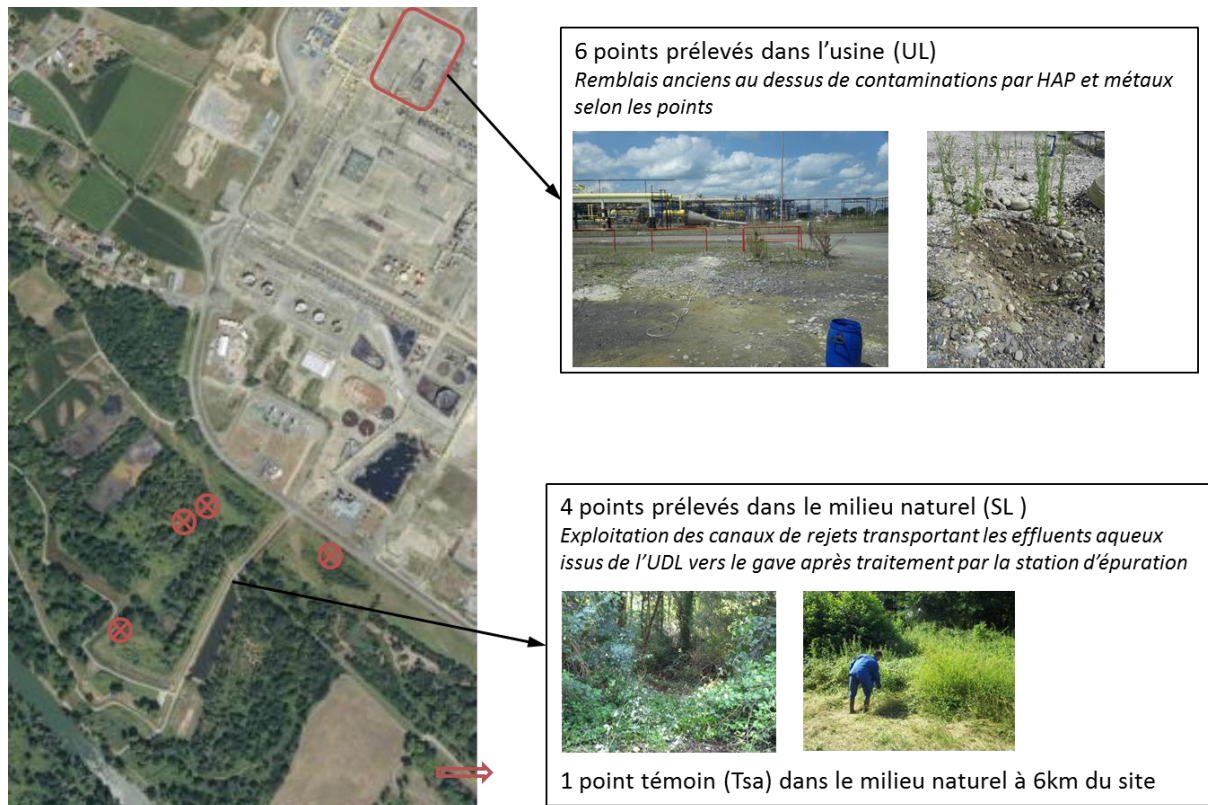
Ainsi, 3 780 tonne de terres polluées ont été extraites puis, pour partie traitées sur place par SECHE ECO-SERVICES (1 200 tonnes) et pour le reste (2 580 tonnes) évacuées hors site vers un centre de stockage de déchets dangereux (classe 1). Les zones excavées ont été remblayées par couches successives avec des matériaux biodégradés provenant des biotretres (terres excavées qui ont été dépolluées par biodégradation), des galets de refus au crible et autres matériaux propres.

### **2.2. Plan du site et échantillonnage**

Deux zones ont été échantillonnées le 5 Août 2014 par la fondation Innovasol : Une zone sur le site de l'usine en cours de réhabilitation et une zone extérieure à proximité du site (milieu naturel) afin d'étudier l'impact possible du site sur l'environnement adjacent. Tout comme pour l'échantillonnage des sols du premier site, les sols ont été prélevés avec des outils manuels (pioche, pelle, râteau) sur les 25 premiers centimètres (sauf mention contraire) et tamisés sur place à 1 cm. Conditionnés en bidon de transport ils ont ensuite été séchés à l'air

libre avant expérimentation. Une fois au laboratoire, ils ont été broyés et tamisés à 2 mm avant d'être stockés à température ambiante dans des flacons en verre ambrés.

Au total, 11 points ont été échantillonnés : 6 dans le site, 4 dans le milieu naturel et 1 témoin négatif situé à six kilomètres du site (Figure 18).



**Figure 18** : Vu d'ensemble des zones d'échantillonnage du site d'étude

#### Les sols du milieu naturel :

Ce milieu correspond à une zone alluviale de forêt et de prairie en bordure de la rivière qui supporte l'exploitation des canaux de rejets transportant les effluents aqueux issus du site vers la rivière après traitement par la station d'épuration. Cinq points ont été présélectionnés en fonction de la synthèse écotoxicologique réalisée par l'URS (avril 2014) et d'une étude de la némaToFaune effectuée par l'entreprise Elisol (mars 2014) sur le site.

Du fait de la pousse de ronciers entre le plan d'échantillonnage et les prélèvements, l'emplacement exact des points repérés et les prélèvements n'ont pu être atteints. Les prélèvements ont donc été réalisés en bordure de chemins d'accès ou en sous-bois. Un point témoin a été prélevé sur une zone naturelle très semblable distante d'environ 6km.

Une description des différents points est donnée dans le Tableau 10.

**Tableau 10** : Description des points de prélèvement des sols du milieu naturel situés à proximité du site industriel d'étude

Points	Description
S1	Lisière de bois en contrebas intérieur du talus. 5-20cm sous la litière et quelques orties et autres herbacées
S2	Bordure du chemin d'accès. Zone superficielle 5-10 cm au-dessus d'un remblai très compact. Echantillonnage moyen sur 3 points distants de quelques mètres
S3	Sous-bois en bordure et léger contrebas du chemin d'accès au piézomètre K3A. 5-20 cm sous la litière. Mélange de sol de forêt et de galets
S4	Bordure de prairie régulièrement débroussaillé et de roncier mélangé à d'autres espèces herbacées ou arbustives.
TSA (Artix)	Entre sous-bois et chemin d'accès remblayé mais couvert de végétation. 5-15 cm.

Les sols du site industriel :

Du fait que le site soit encore en activité et de la politique de sécurité appliquée, seul un lot du site a pu être échantillonné, 12 points ont été présélectionnés en fonction des concentrations en métaux, hydrocarbures, HAP, BTEX que ces sols pouvaient contenir d'après des analyses chimiques précédentes. L'usine étant en réhabilitation, ce lot est constitué, en surface, de remblais datant de plusieurs années. La nature de ce substratum et le temps imparti n'ont permis de prélever que 6 points choisis en fonction de la diversité des contaminations supposées, de la répartition sur le site et de l'aspect du « sol ».

Le Tableau 11 en donne un rapide descriptif.

**Tableau 11** : Caractéristiques des points de prélèvement de sol sur le site industriel étudié

Points	Description	Type de contamination
146	Zone de remblais fortement compactés sans végétation. 0-10/15 cm.	HAP
148	Zone très faiblement végétalisée. Remblai compact 0-20cm	Faible contamination (témoin pour site ?)
168	Zone comportant quelques herbacées. 0-20 cm	Chrome et Zinc
171	Zone comportant quelques herbacées 0-20 cm	Arsenic
4	Zone comportant quelques herbacées 0-20 cm	Contamination moyenne en hydrocarbures
70	Remblais gravillonnés sans végétation 0-20 cm	BTEX



### **1. Troisième cas d'étude : Une boue de station d'épuration urbaine, amendement possible pour la réhabilitation des sols industriels pollués ?**

Les boues de station d'épuration correspondent aux déchets générés lors du traitement des eaux usées. Elles sont constituées de matière organique et de matière minérale. Elles peuvent être plus ou moins liquides et organiques. Il existe plusieurs types de boues en fonction de la façon dont elles sont générées :

- Les boues primaires qui correspondent aux dépôts récupérés par une simple décantation des eaux usées. Elles présentent des concentrations élevées en matières minérale mais aussi en matière organique pouvant évoluer.
- Les boues physico-chimiques, elles ressemblent aux boues primaires sauf que durant le traitement de l'eau usée, il a été rajouté un réactif (sels de fer, d'aluminium, et autres agents flocculant) pour agglomérer les fines particules et améliorer la décantation.
- Les boues biologiques, appelées également boues secondaires, elles proviennent d'une épuration biologique des eaux. Ces boues sont très organiques car elles sont principalement constituées de corps bactériens et de leurs sécrétions.

La production de boues des eaux usées domestiques en France est importante. En 2008, la quantité totale de boues issues du traitement des eaux usées domestiques était estimée à 1 180 000 tonne de matière sèche (MEEDDA, 2009).

Une fois générée, ces boues subissent différents traitements afin de réduire leur quantité d'eau présente (augmentation de la siccité) et éliminer les organismes pathogènes (hygiénisation). Elles peuvent alors être éliminées ou valorisées (MEEDDA, 2009 ; AMORCE, 2012):

- Mise en centre d'enfouissement technique de stockage de déchets non dangereux, les boues doivent respecter des normes comme une siccité minimale de 30%.
- L'incinération spécifique ou la co-incinération avec des ordures ménagères (et valorisation énergétique).
- L'épandage en agriculture (réalisé en routine), sur parcelles forestières et à la revégétalisation.
- Le compostage (Syndicat Mixte Recyclage Agricole du Haut-Rhin, 2001)

En France, la majorité des boues de station d'épuration sont valorisées de nos jours. En 2010, 43% des boues produites en France ont été épandues, 33% compostées (destiné à l'agriculture et l'horticulture), 18% incinérées et 4% placées en centre d'enfouissement (AMORCE, 2012). Cependant, du fait de leur toxicité potentielle l'élimination des boues et leur valorisation est encore taboue dans notre société. C'est pourquoi celle-ci sont très réglementées. Leur statut dépend de deux textes réglementaires que sont le code de l'environnement (articles R211-25 à R211-47) où elles sont considérées comme « les sédiments résiduels des installations de traitement ou de prétraitements biologique, physique ou physico-chimique des eaux usées » et le code rural où elles sont considérées comme des matières fertilisantes (articles L255-1 à L255-11). Pour l'épandage et le compostage, les boues ne peuvent être utilisées que si et seulement si elles présentent un intérêt pour l'alimentation des cultures. De plus, ces épandages nécessitent un plan d'épandage ainsi que la tenue à jour d'un registre d'épandage. Pour les stations d'épuration de plus de 2000 d'équivalents habitants, un programme d'épandage prévisionnel annuel et un bilan annuel d'épandage sont à réaliser en plus. Les contaminants suivis permettant un épandage des boues de station d'épuration sur les sols

concernent seulement 7 ETM, 7 PCB et 3 HAP (voir Tableau 12). Ce suivi est réalisé sur les boues et pour les ETM sur le sol agricole où la boue est épandue.

**Tableau 12** : Teneur limite réglementaire des polluants suivis dans les boues pour qu'elles soient utilisables en épandage selon la réglementation française (mg/kg de matière sèche).  
Source : MEEDDA, 2009.

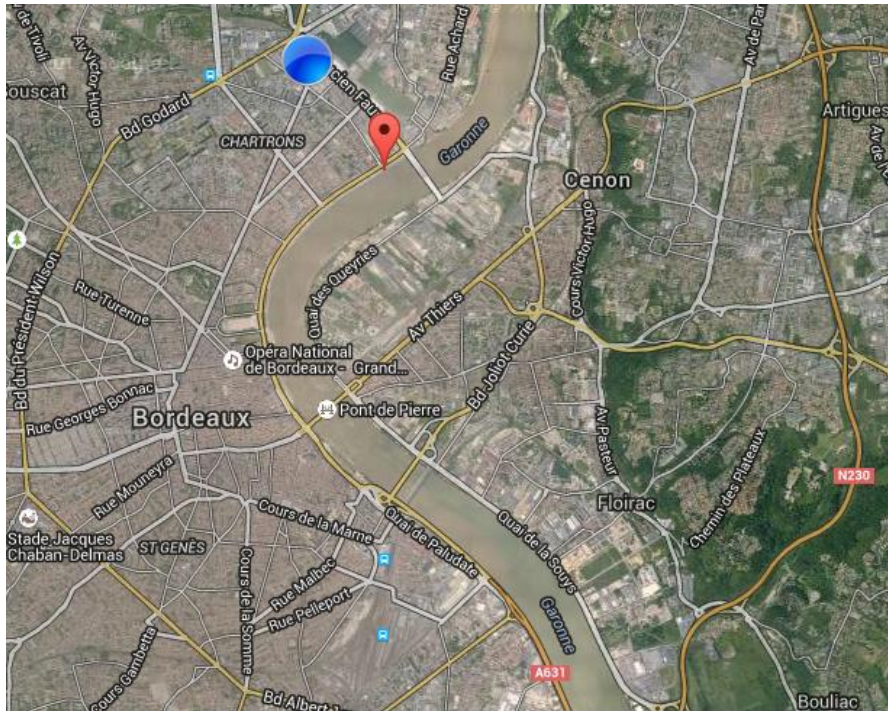
	Teneur limite (ETM)		Teneur limite (micropolluants organiques)
Cadmium (Cd)	10	Total des 7 PCB principaux (28, 52, 101, 118, 138, 153, 180)	0,8
Chrome (Cr)	1000		
Cuivre (Cu)	1000		
Mercure (Hg)	10		
Nickel (Ni)	200		
Plomb (Pb)	800		
Zinc (Zn)	3000		
Cr+Cu+Ni+Zn	4000	Fluoranthène	5
		Benzo(b)fluoranthène	2,5
		Benzo(a)pyrène	2

Les sols des sites industriels sont des sols souvent « traumatisés » ayant subi du compactage, des contaminations chimiques ainsi que d'autres effets délétères affectant leur fonctionnement naturel (voir la synthèse bibliographique). Un moyen de leur permettre de retrouver un couvert végétal (revégétalisation) est d'utiliser les boues d'épuration comme amendement afin d'apporter de la matière organique et des fertilisants. Ceci permet de recréer un environnement favorable à la faune et la flore ainsi qu'à une microfaune (bactéries...) biodégradant les contaminants organiques des sols. Cependant, comme cela a été vu plus haut, la réglementation d'épandage des sols ne suit qu'une liste restreinte de molécules (7 ETM, 7 PCB et 3 HAP). Or les stations d'épuration urbaines sont le réceptacle de l'ensemble des contaminants urbains tels que des pesticides, des médicaments... (Díaz-Cruz et al., 2009 ; Nieto et al., 2010 ; Tadeo et al., 2012). Ces boues peuvent être une source de contamination supplémentaire au niveau des sols industriels si elles sont utilisées comme amendement et augmenter le risque environnemental lié aux sols amendés. C'est pourquoi une approche EDA est intéressante à appliquer à ce type de matrice. Elle permet de vérifier si les boues d'épuration ne contiennent pas des contaminants organiques non ciblés par les analyses réglementaires et biologiquement actifs. De plus il s'agit de matrices solides très organiques. L'utilisation de l'approche sur les boues de station d'épuration permet également de voir si elle est applicable aux matrices solides très organiques.

La boue utilisée pour l'étude vient d'une station d'épuration urbaine de l'agglomération de Bordeaux, nommée Louis Fargues.

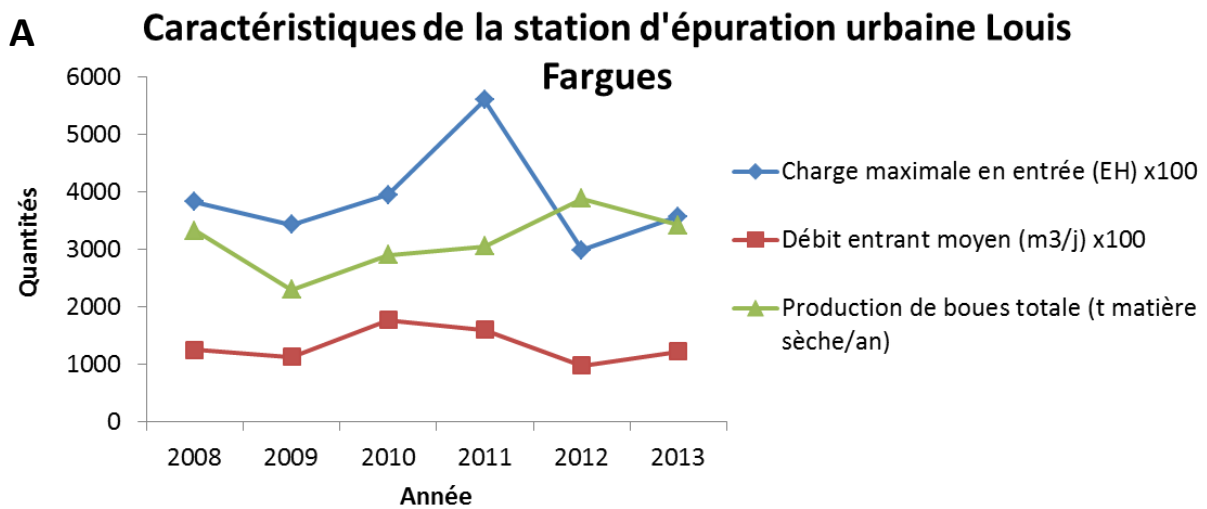
## 2. Caractéristiques de la station d'épuration Louis fargues

Cette station d'épuration urbaine située au nord de la ville de Bordeaux a été mise en service en 1974 (Figure 19). Elle possède une capacité nominale de 300 000 équivalents habitant et un débit de référence de 135 000 m<sup>3</sup>/j. Cette installation est conforme aux normes françaises (<http://assainissement.developpement-durable.gouv.fr/>).



**Figure 19** : Localisation de la station d'épuration Louis Fargues (point bleu) et du point de rejet des eaux usées dans l'environnement (marqueur rouge).

Les Figures 20A et 20B présentent l'évolution entre 2008 et 2013 des principales caractéristiques de cette station ainsi que de la quantité des boues produites et de leur devenir.



## B Destination d'élimination ou de valorisation des boues d'épuration de la station Louis Fargue



**Figure 20** : Caractéristiques annuelles de la station d'épuration Louis Fargues (A) et devenir des boues générées par an (B)

La quantité de boues produites par cette station d'épuration reste stable avec une production d'environ 3 000 tonnes de matière sèche par an. Ces boues peuvent présenter une manne pour la réhabilitation des sols. Il est à noter que la plupart de ces boues sont déjà valorisées en compostage et/ou épandage (Figure 24B).

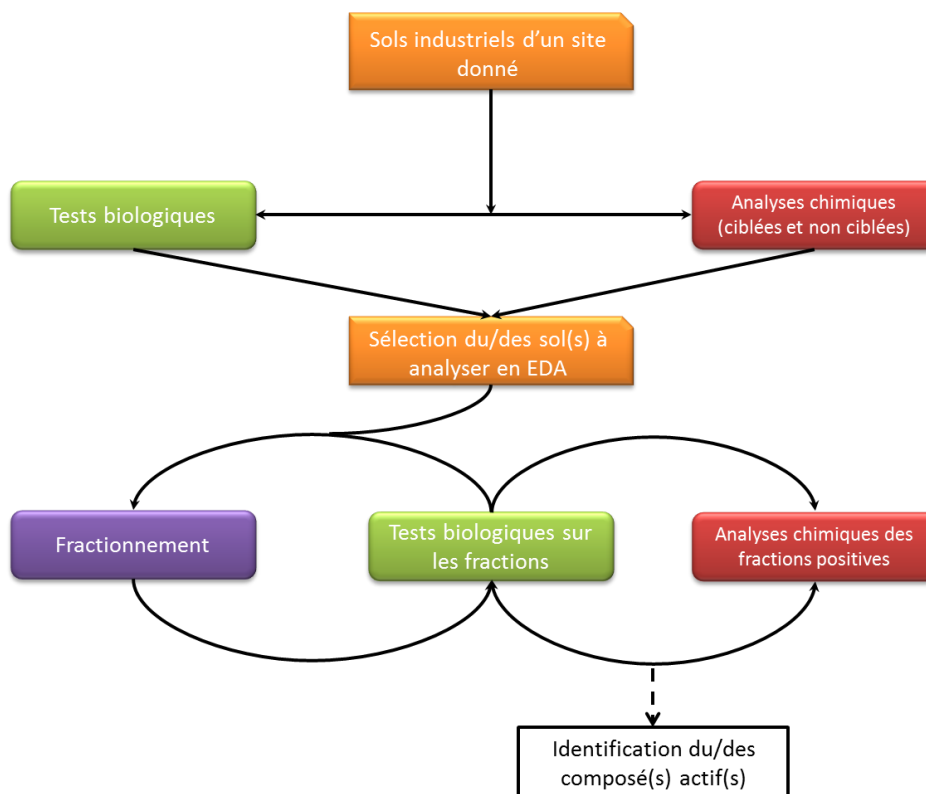
Après échantillonnage, tout comme les sols des deux sites d'étude, la boue a été séchée, broyée et tamisée à 2 mm avant d'être stockées à température ambiante dans des flacons en verre ambrés.

## II. La démarche d'étude d'un site

Le mode opératoire suit une démarche d'analyse dirigée par l'effet. Cependant il est peu pertinent de réaliser ce type d'analyse sur l'ensemble des sols échantillonnés d'un site. Les résultats montreraient de la redondance du fait de l'origine souvent commune de la contamination. C'est pourquoi une étude préliminaire est réalisée sur l'ensemble des sols d'un site pour sélectionner le(s) meilleur(s) candidat(s) pour l'approche EDA. Cette étude préliminaire comprend :

- Des tests biologiques (Test des perturbateurs endocriniens, test de toxicité aiguë et test AhR) pour voir à quels tests les sols répondent et les hiérarchiser les uns par rapport aux autres en fonction de leur activité.
- Des analyses ciblées sur les polluants prioritaires (HAP et PCB essentiellement).
- Une analyse en GC-MS en mode balayage : Ceci permet d'obtenir l'empreinte chromatographique des sols. Cette analyse n'a pas pour but d'identifier des composés en soi mais permet de voir si des sols se démarquent les uns par rapport aux autres ou s'ils présentent tous un même profil chromatographique.

Au final la démarche EDA a été adoptée comme suit :



**Figure 21** : Schéma du mode opératoire de l'analyse d'un site d'étude

Les différentes étapes de l'analyse sont expliquées en détail dans la suite du document. Des recherches bibliographiques sont également présentées afin d'expliquer le choix de certaines techniques pour effectuer ce travail.

### III. Méthode d'extraction des contaminants

L'extraction est l'étape qui consiste à séparer les contaminants de la matrice afin de pouvoir les analyser chimiquement et biologiquement. Il existe différentes méthodes d'extraction possédant des avantages et des inconvénients qui leur sont propres. Le choix de la méthode d'extraction est très important dans une démarche d'analyse non ciblée telle que l'analyse dirigée par l'effet. En effet, la recherche d'inconnus nécessite l'utilisation de méthodes permettant l'extraction d'un large spectre de molécules aux caractéristiques physico-chimiques variables. Cependant, cette méthode doit aussi être rapide, automatisable et être réalisable à haut débit pour réduire le temps d'étude appliqué à un site. De plus, elle doit assurer un niveau d'extraction acceptable des contaminants pour être représentative du niveau de contamination de la matrice, robuste et limiter les étapes de traitement des échantillons qui peuvent être à l'origine de perte de composés.

Il est à noter que la perte de composés lors du processus de préparation de l'échantillon reste la principale contrainte de l'analyse dirigée par l'effet. Effectivement, l'utilisation d'étalons internes est à proscrire du fait de leur réponse biologique possible et leur impact sur les bioessais. Cependant, il existe des moyens permettant d'évaluer la perte de composés lors de l'analyse dirigée par l'effet. Ils seront présentés par la suite dans ce document (voir la partie IX : La démarche qualité appliquée lors des expériences).

## 1. Les différentes méthodes d'extraction appliquées aux matrices solides

Il existe six méthodes d'extraction de contaminants à partir des matrices solides qui sont très bien présentées dans un article de Lau et al. (2010) :

- Le Soxhlet qui permet une extraction par le reflux d'un solvant chauffé. Techniquement, le solvant placé dans un ballon est porté à ébullition permettant aux vapeurs de passer à travers un bras de dérivation dans un condenseur, où elles se condensent et coulent à nouveau sur un niveau où l'échantillon est contenu dans une cartouche. En s'accumulant, le solvant atteint le haut du bras d'un siphon, le solvant et l'extrait sont alors siphonnés dans le ballon inférieur, et le cycle est répété jusqu'à ce que tout l'échantillon soit complètement extrait dans le ballon plus bas.
- L'extraction par agitation où l'échantillon est mélangé à un solvant et laissé sous agitation pendant un temps donné. Après filtration, l'extrait contenant les composés est récupéré.
- L'extraction par ultrason qui fonctionne comme la précédente sauf que la technique fait intervenir l'énergie acoustique d'ondes ultrasonores avec une fréquence minimale de 16 kHz dans un liquide. Ceci provoque une compression rapide et une raréfaction de circulation du fluide se traduisant par un phénomène de cavitation. Cette agitation est réalisée en plaçant l'échantillon dans un mélange de solvants plongés directement dans un bain à ultrasons.
- L'extraction accélérée par solvant (accelerated solvent extraction : ASE)/L'extraction par fluide pressurisé (pressured fluid extraction : PFE) qui consiste à exposer l'échantillon à un solvant sous forme liquide au-dessus de son point d'ébullition grâce à une élévation de la pression. Ceci permet d'exposer davantage de l'échantillon au solvant d'extraction en diminuant sa viscosité, en augmentant sa température et en conférant une meilleure solubilité des contaminants.
- L'extraction par micro-ondes où l'échantillon est placé avec un solvant dans un flacon hermétique au sein d'un four à micro-ondes. Les composés sont extraits grâce à un chauffage au sein de la matière par des longueurs d'ondes électromagnétiques comprises entre 1mm et 1m et possédant des fréquences de 300 MHz à 300 GHz. Ce procédé d'extraction est très similaire à une extraction accélérée par solvant.
- Extraction par un fluide supercritique. Les fluides supercritiques correspondent à de la matière exposée à des conditions particulières de températures et de pressions permettant à ces fluides de posséder à la fois les caractéristiques d'un liquide et d'un gaz. Ceci confère la capacité à ces fluides de pénétrer facilement la matrice et de dissoudre facilement les composés présents dans l'échantillon.

Le Tableau 13 regroupe les caractéristiques de l'ensemble des techniques d'extraction ainsi que leurs avantages et leurs inconvénients.

**Tableau 13:** Avantages et inconvénients de l'ensemble des méthodes d'extraction des matrices solides

Méthode d'extraction	Avantages	Inconvénients
<b>Soxhlet</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Très fiable avec peu de variation d'extraction</li> <li>- Technique d'extraction de référence</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Quantité de solvant à utiliser (&gt;150 mL de solvant)</li> <li>- Sa longueur (&gt;24h)</li> <li>- Matériel encombrant et difficulté de faire des extractions à haut débit</li> <li>- Extraction importante de la matière organique</li> </ul>
<b>Agitation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Peu chère</li> <li>- Peu de matériel</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Faible niveau d'extraction</li> <li>- Extraction variable</li> <li>- Extraction longue pour obtenir des résultats fiables et peu variables</li> <li>- Nécessite une centrifugation ou une filtration de l'extrait</li> </ul>
<b>Ultrasons</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Peu chère</li> <li>- Peu de matériel</li> <li>- Résultats d'extraction comparables au Soxhlet</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dégradation des contaminants</li> <li>- Nécessite une centrifugation ou une filtration de l'extrait</li> <li>- Déstructuration de la matrice entraînant une possible diminution d'efficacité d'extraction</li> </ul>
<b>ASE/PFE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bon rendement d'extraction</li> <li>- Peu de variations dans les rendements</li> <li>- Consommation faible de solvants</li> <li>- Rapidité d'extraction</li> <li>- Automatisation et haut débit</li> <li>- Purification incluse dans le processus d'extraction</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Matériel coûteux</li> <li>- Extraction importante de la matière organique</li> </ul>
<b>micro-ondes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rapidité d'extraction</li> <li>- Automatisation et haut débit</li> <li>- Reproductibilité</li> <li>- Consommation faible de solvant et d'énergie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Matériel coûteux</li> <li>- Nécessite une centrifugation ou une filtration de l'extrait</li> </ul>
<b>Fluide supercritique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bon rendement d'extraction</li> <li>- Peu de variations dans les rendements</li> <li>- Faible extraction de la matière organique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Difficulté d'optimisation</li> <li>- Matériel très complexe pouvant entraîner des résultats incohérents</li> <li>- Matériel coûteux</li> </ul>

Plusieurs analyses dirigées par l'effet impliquent des matrices environnementales solides issues du milieu aquatique (sédiments, matière en suspension) ou atmosphérique (particules). Les méthodes d'extraction les plus utilisées restent le soxhlet, l'ASE et les ultrasons (Tableau 14).

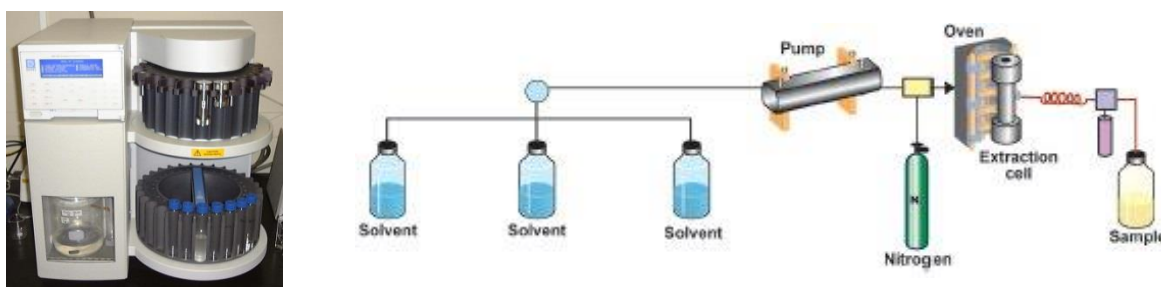
**Tableau 14** : Méthodes d'extraction utilisées sur les matrices solides lors de l'approche EDA trouvées dans la littérature (DCM : Dichlorométhane ; N.D : Non déterminé)

Méthode d'extraction	Matrice	Solvants utilisés	Molécules/familles de composés identifiées	Source
ASE	Sédiment	DCM: Acétone (3:1)	HAP, 17 $\beta$ -Estradiol et ses métabolites	Houtman et al. 2006
	Sédiment	Hexane : Acétone (1 :1)	HAP et HAP alkylés	Kaisarevic et al. 2009
	Sol	DCM: Acétone (3:1)	11H-benzo[b]fluorène, 9-méthylacridine, 4-et 2-azapyrène et phénylquinoline	Legler et al. 2011
	Sédiment	DCM: Acétone (3:1)	Bisphenol A	Schmitt et al. 2011
	Sédiment	DCM: Acétone (?)	Nitro-HAP, azarènes, cétones, quinones, composés hydroxylés, lactones et acides carboxyliques	Varel et al. 2012
	Sédiment	Extraction séquentielle : - 3% acétone dans hexane - 0,02% TFA dans acétone pH=2 - Méthanol	HAP, anti-inflammatoires non-stéroïdiens, muscs polycycliques, fragrances et pesticides	Regueiro et al. 2013
	Sédiment	DCM: Acétone (3:1)	Xenoeostrogènes, alkylphénols et estrone	Fetter et al. 2014
	Sol	Hexane : Acetone (1 :1)	HAP et oxy-HAP	Wincent et al. 2015
Soxhlet	Particules atmosphériques	méthylène chloride et méthanol (Séquentielle)	N.D (mutagènes)	Nishioska et al. 1985
	Particules atmosphériques	DCM	Nitro-HAP	Arey et al. 1992
	Particules atmosphériques	DCM et Acétone (séquentielle)	HAP, nitro-HAP et hydroxynitro-HAP	Greenberg et al. 1992
	Sédiments	DCM et méthanol (séquentielle)	HAP	Marvin et al. 2000
	Matières en suspension	DCM	HAP	Wölz et al. 2010
Ultrasons	Sédiments	DCM et méthanol (séquentielle)	HAP	Marvin et al. 1994
	Particules atmosphériques	DCM	Cétones aromatiques, quinones et aldéhydes	Casellas et al. 1994
	Sédiments	DCM et méthanol (séquentielle)	HAP	Marvin et al. 1999
	Matières particulaires d'échappement de diesel	DCM	N.D	Oh et al. 2006



## 2. Choix de l'extraction accélérée par solvant et la méthode employée

La méthode d'extraction choisie pour les échantillons a été l'extraction par ASE qui présente comme l'a montré le Tableau 13 de nombreux avantages. Elle permet une extraction automatisable à haut débit, autorise l'utilisation de mélanges de solvants et ne nécessite pas d'étape de filtration. Son utilisation importante dans les approches d'analyse dirigée par l'effet en fait une méthode d'extraction de choix (Tableau 14). De plus, Creusot (2011) a testé durant sa thèse différentes méthodes d'extraction par ASE afin d'être le plus exhaustif quant au panel de contaminants extraits. Son étude a mis en avant que l'utilisation d'un mélange de dichlorométhane et de méthanol dans des proportions égales (50:50 ; v:v) permet l'extraction d'une large gamme de composés possédant des propriétés physico-chimiques différentes, ce qui est nécessaire pour l'approche EDA qui cible des composés inconnus. Toutes les extractions ont donc été effectuées grâce à des extractions ASE que ce soit pour les analyses ciblées (dosage des HAP et des PCB) ou l'analyse dirigée par l'effet (Figure 22).



**Figure 22** : Photographie d'un ASE 200<sup>®</sup> et de son principe de fonctionnement

Les paramètres utilisés pour les extractions ont été les suivants :

- Extraction pour l'analyse dirigée par l'effet

L'extraction est réalisée sur une quantité de sol pouvant être comprise entre 0,1-1 gramme de sol (0,1g pour un sol très contaminé et 1g pour un sol d'un milieu naturel). Au-delà de ces quantités, la matière organique naturellement présente dans les sols poserait des problèmes dans la suite de l'analyse lors de la concentration de l'extrait du fait de sa précipitation. Après extraction, les échantillons sont évaporés sous flux d'azote à 45°C jusqu'à obtenir un volume de 1,8 mL (contrôle gravimétrique) d'un mélange méthanol : dichlorométhane (1 :1). Ils sont ensuite conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

**Tableau 15** : Paramètres de la méthode d'extraction par ASE pour l'analyse dirigée par l'effet (MeOH : méthanol ; DCM : dichloromethane)

<b>Heat :</b>	5 minutes	<b>Cycles :</b>	4
<b>Static :</b>	5 minutes	<b>Pression :</b>	100 bars
<b>Flush :</b>	60%	<b>Température :</b>	75 °C
<b>Purge :</b>	60 secondes	<b>Solvants :</b>	MeOH/DCM (1 :1 ; v :v)

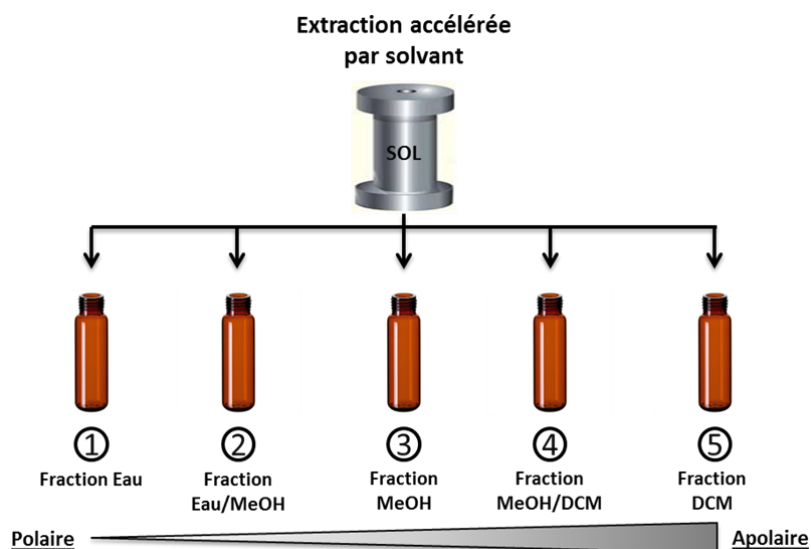
- Extraction pour le test de fractionnement grâce à une extraction séquentielle (test d'additivité des fractions)

Cette méthode d'extraction a pour but de simplifier l'approche EDA en permettant un préfractionnement de l'échantillon directement lors de l'extraction grâce à une extraction séquentielle avec un gradient de polarité. Elle permet également de vérifier si la théorie d'additivité des effets fonctionne (voir la section IV. 4. Equilibre des masses : Lien entre les analyses chimiques et biologiques). Tout comme les extraits réalisés pour l'analyse dirigée par l'effet, les échantillons sont concentrés jusqu'à obtenir un volume de 1,8 mL environ dans le solvant ou le mélange de solvant qui a permis son extraction (exception faite pour les extraits contenant de l'eau qui sont repris uniquement dans du méthanol). Ils ont ensuite été conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

Cette expérience a été réalisée sur deux sols du site A. Après l'extraction, 100µL de chaque fraction ont été prélevés, évaporés et transférés dans 100µL de DMSO pour les bioessais. Pour le test d'additivité, les 5 fractions ont été regroupées selon les 26 combinaisons possibles (voir Figure 23). Pour cela, 50µL des fractions impliquées dans les regroupements ont été prélevés et mélangés avant d'être repris dans 50µL de DMSO. Enfin, les activités biologiques expérimentales ont été comparées aux activités biologiques théoriques obtenues par la théorie additive.

**Tableau 16** : Paramètres de la méthode d'extraction par ASE pour un fractionnement lié à une extraction séquentielle (MeOH : méthanol ; DCM : dichlorométhane)

Extraction	Solvants	Cycles	Chauffage	statique	Rinçage	Purge	Pression (bar)	Temp (°C)
1 cellule ASE	Eau	2	5 min	5 min	60	60	100	75
	Eau/MeOH (1 : 1 ; v : v)	2	5 min	5 min	60	60	100	75
	MeOH	2	5 min	5 min	60	60	100	75
	MeOH/DCM (1 : 1 ; v : v)	2	5 min	5 min	60	60	100	75
	DCM	2	5 min	5 min	60	60	100	75



Fraction Regroupement	1 Eau	2 Eau/Methanol (1 :1)	3 MeOH	4 MeOH/DCM (1 :1)	5 DCM
1	√	√			
2	√		√		
3	√			√	
4	√				√
5		√	√		
6		√		√	
7		√			√
8			√	√	
9			√		√
10				√	√
11	√	√	√		
12	√	√		√	
13	√	√			√
14		√	√	√	
15		√	√		√
16			√	√	√
17	√		√	√	
18	√		√		√
19	√			√	√
20		√		√	√
21	√	√	√	√	
22	√	√	√		√
23	√	√		√	√
24	√		√	√	√
25		√	√	√	√
26	√	√	√	√	√

**Figure 23**: Schéma et Tableau explicatifs du protocole expérimental pour l'extraction séquentielle et le test d'additivité des fractions. L'ensemble des 26 regroupements réalisés ont été testés biologiquement et le resultat comparé à celui de l'activité biologique théorique en additionnant l'activité des fractions testées séparément. DCM : dichloromethane ; MeOH : methanol ; √ : Fraction présente dans le regroupement.

- Paramètres d'extraction pour les analyses ciblée sur les PCB (Tableau 17)

**Tableau 17**

<b>Heat :</b>	5 minutes	<b>Cycles :</b>	1
<b>Static :</b>	10 minutes	<b>Pression :</b>	100 bars
<b>Flush :</b>	60%	<b>Température :</b>	100 °C
<b>Purge :</b>	60 secondes	<b>Solvants :</b>	DCM

- Paramètres d'extraction pour les analyses ciblées sur les HAP (Tableau 18)

**Tableau 18**

<b>Heat :</b>	5 minutes	<b>Cycles :</b>	2
<b>Static :</b>	8 minutes	<b>Pression :</b>	100 bars
<b>Flush :</b>	60%	<b>Température :</b>	100 °C
<b>Purge :</b>	120 secondes	<b>Solvants :</b>	DCM

#### **IV. Le screening préliminaire des sols d'un site pour choisir les meilleurs candidats à fractionner**

Ce criblage a pour but, comme cela a été vu plus haut, de sélectionner le(s) sol(s) le(s) plus pertinent(s) à fractionner. Il permet également d'identifier les points chauds de contamination en hiérarchisant les sols en fonction des résultats des bioessais et des analyses ciblées. Ainsi cette première approche fournit pour un site les informations importantes sur les zones à risque et à dépolluer en premier. Cette approche doit bien entendu être accompagnée d'autres analyses telles que celle des éléments traces métalliques non-prises en compte dans ce travail.

##### **1. Analyses chimiques**

Les analyses chimiques sont primordiales. Elles donnent une première idée du niveau et du type de contamination des sols étudiés. De plus, en utilisant les facteurs d'équivalent toxique (TEF ; voir la section IV. 4. Equilibre des masses : Lien entre les analyses chimiques et biologiques), il est possible de savoir grâce à elles si l'ensemble des contaminants dosés lors des analyses ciblées expliquent les réponses biologiques observées. Ainsi, elles permettent de mesurer l'importance d'utiliser l'analyse dirigée par l'effet sur un site, et d'arrêter le processus si cette dernière n'est pas utile.

##### **1.1. Analyses ciblées**

Ces analyses consistent à doser une liste restreinte de molécules pouvant être présentes dans les sols. Du fait de l'activité des sites et de la réglementation, elles ont été orientées principalement sur les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les polychlorobiphényles (PCB). Les alcanes n'ont pas été recherchés car ils présentent en général une toxicité moindre ainsi qu'une biodégradation rapide par les bactéries des sols en acide gras et/ou en alcool (voir la synthèse bibliographique). De même, les hydrocarbures chlorés qui sont des polluants souvent présents au niveau des sites industriels sont utilisés lors des analyses de laboratoire (ex : DCM), ils ne peuvent donc pas être étudiés du fait de leur perte lors de certains processus de traitement des échantillons (ex : évaporation au flux d'azote).

##### **1.1.1. Quantification des composés et dosage interne**

Le dosage des composés dans les échantillons a été réalisé par étalonnage interne. En chromatographie, l'aire du pic chromatographique obtenu pour chaque molécule lors de l'analyse est proportionnelle à la quantité massique des composés présents. Cette relation amène ainsi aux équations suivantes :

$$\text{Équation 2, } A_i = k_i \cdot m_i$$

$$\text{Équation 3, } A_e = k_e \cdot m_e$$

Avec,  $A_i$  = l'aire du composé  $i$ ,

$A_e$  = l'aire de l'étalon interne de quantification  $e$ ,  
 $m_i$  = la masse du composé  $i$ ,  
 $m_e$  = la masse de l'étalon interne de quantification  $e$ ,  
 $k_i$  = le facteur de réponse du composé  $i$ ,  
 $k_e$  = le facteur de réponse de l'étalon interne de quantification  $e$ .

Ce qui conduit au rapport,

$$\frac{A_e}{A_i} = \frac{k_e \cdot m_e}{k_i \cdot m_i}$$

Soit,

$$\text{Équation 4, } K_i = \frac{k_e}{k_i} = \frac{A_e \cdot m_i}{A_i \cdot m_e}$$

Où  $K_i$  représente le coefficient de réponse du composé  $i$  par rapport à son étalon interne.

Le coefficient de réponse est déterminé par l'injection d'une solution étalon constituée de l'ensemble des composés et des étalons internes en concentration connue. Il sera égal à 1 lorsque l'analyte possède son analogue marqué en étalon interne. La masse du composé  $i$  dans l'échantillon est déterminée d'après la formule suivante :

$$\text{Équation 5, } m_i = \frac{K_i \cdot A_i \cdot m_e}{A_e}$$

#### 1.1.2. Analyse des PCB

Afin d'analyser les PCB, il est nécessaire avant tout de les purifier. Pour cela, après extraction, les échantillons sont purifiés sur silice acide (Müller et al., 2001; Tapie et al., 2008). Ils sont ensuite analysés par chromatographie gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons (GC-ECD ; Agilent technologies, série G 1530 N pour la GC, série G 2397 A pour le détecteur).

L'analyse des PCB a porté sur un ensemble de 26 PCB : 8, 18, 28, 29, 44, 50, 52, 66, 77, 87, 101, 104, 105, 118, 126, 128, 138, 153, 170, 180, 187, 188, 195, 201, 206 et 209.

*Remarque : Les pesticides organochlorés comme le DDT ou la dieldrine font également partie de cette analyse. Cependant aucun pesticide de ce type n'a été détecté dans les sols étudiés.*

**Tableau 19** : Paramètres d'injection en GC-ECD pour l'analyse des PCB présents dans les sols.

Eléments	Paramètres
Colonne	HP5-MS (Agilent technologies, Massy, France) 5 % Phényle- 95 % Méthyl siloxane (60 m x 250 µm x 0,25 µm)
Mode d'injection/Température/ débit de purge	Sans division pulsé (25 psi) / 280°C / 60 mL.min <sup>-1</sup> pendant 2 min
Volume d'injection	1 µL (Isooctane)
Gaz vecteur	Hélium (99.9996%)
Débit	1,3 mL.min <sup>-1</sup>
Gradient de température	Température initiale : 80°C pendant 2 min puis 2°C.min <sup>-1</sup> jusqu'à 280°C
Température du détecteur	300°C
Temps d'acquisition	102 min

**Tableau 20** : Molécules chlorées analysées dans les sols par GC-ECD. L'étalon interne de rendement utilisé est l'octachloronaphthalene (OCN). PCB, polychlorobiphényle ; DDE , dichlorodiphényldichloroéthylène ; DDD, dichlorodiphényldichloroéthane ; DDT, dichlorodiphényltrichloroéthane ; PBDE, polybromodiphényléther ; LQ, limite de quantification instrumentale (Rapport signal/bruit = 9).

Famille	Composés	Étalons internes de quantification	LQ <sup>1</sup> (pg injecté)
Polychlorobiphényle	PCB8	PCB30	0.46
	PCB18	PCB30	0.32
	PCB29	PCB30	0.18
	PCB50	PCB30	0.19
	PCB28	PCB30	0.20
	PCB52	PCB30	0.22
	PCB104	PCB103	0,19
	PCB44	PCB30	0,17
	PCB66	PCB30	0,19
	PCB101	PCB103	0,16
	PCB87	PCB103	0.13
	PCB77	PCB103	0.38
	PCB154 (+2,4'DDD)	PCB155	0.19
	PCB118	PCB103	0.17
	PCB188	PCB198	0.16
	PCB153	PCB155	0.16
	PCB105	PCB103	0.13
	PCB138	PCB155	0.12
	PCB126	PCB155	0,28
	PCB187	PCB198	0,13
	PCB128	PCB155	0,11
	PCB201	PCB198	0,13
	PCB180	PCB198	0,11
	PCB170	PCB155	0,10
PCB195	PCB198	0,10	
PCB206	PCB198	0,10	
PCB209	PCB198	0,12	
Pesticides organochlorés	Hexachlorobenzène	4,4'-DDT-d8	0.07
	Lindane	4,4'-DDT-d8	0.07
	Heptachlor	4,4'-DDT-d8	0,09
	Aldrin	4,4'-DDT-d8	0.10
	Heptachlore-époxyde	4,4'-DDT-d8	0,09
	2,4'-DDE	4,4'-DDT-d8	0.13
	Cis- $\alpha$ -chlordane	4,4'-DDT-d8	0,09
	Trans- $\gamma$ -chlordane	4,4'-DDT-d8	0,09
	Dieldrin	4,4'-DDT-d8	0.11
	4,4'DDE	4,4'-DDT-d8	0.10
	2,4'-DDD (+PCB154)	4,4'-DDT-d8	0.19
	Mirex	4,4'-DDT-d8	0.12
	2,4'-DDT	4,4'-DDT-d8	0,20
	4,4'-DDT	4,4'-DDT-d8	0,20

### 1.1.3. Analyse des HAP

Les analyses ont porté sur les 16 HAP de la liste US-EPA ainsi que sur 2 autres HAP (le Benzo[e]pyrène et le Pérylène) et 2 CAP soufrés (le Dibenzothiophène et le Benzo[b]naphtho[2,1-d]thiophène). Tout comme pour l'analyse des PCB, les extraits ont été purifiés (Baumard et al., 1996 ; Baumard et al., 1997) avant d'être analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS : GC série 6890 et détecteur, série 5973, Agilent technologies, Germany).

**Tableau 21** : Paramètres d'analyse par GC-MS pour l'analyse des HAP présents dans les sols.

Eléments	Paramètres
Colonne	HP5-MS (Agilent technologies, Massy, France) 5 % Phényle- 95 % Méthyl siloxane (30 m x 250 µm x 0,25 µm)
Source / énergie	Impact électronique / 70 ev
Mode d'injection/Température/ débit de purge	Sans division pulsée (25 psi) / 280°C / 60 mL.min <sup>-1</sup> pendant 1,5 min
Volume d'injection	1 µL (Isooctane ou Dichloromethane)
Gaz vecteur	Hélium (99.9996%)
Débit	1,3 mL.min <sup>-1</sup>
Gradient de température	50 C pendant 2 min , 10°C.min <sup>-1</sup> jusqu'à 250 C, 2°C.min <sup>-1</sup> jusqu'à 280°C, puis 10°C.min <sup>-1</sup> jusqu'à 310 C maintenu durant 10 min
Temps d'acquisition	52 min

**Tableau 22** : HAP analysés lors du dosage par GC-MS. Les étalons internes de rendement utilisés sont le Pyrene-d10 et le Benzo(b)fluoranthène-d12. LQ : limite de quantification instrumentale extrapolée (Rapport signal/bruit = 9, n=3).

Composés	Étalons internes de quantification	Ion de quantification (m/z)	LQ (pg injecté)
naphtalène	naphtalène-d8	128	0,57
acénaphthylène	phénanthrène-d10	152	1,00
acénaphthène	phénanthrène-d10	154	1,42
fluorène	phénanthrène-d10	166	0,68
dibenzothiophène	dibenzothiophène-d8	184	0.21
phénanthrène	phénanthrène-d10	178	0,74
anthracène	anthracène-d10	178	1,14
fluoranthène	fluoranthène-d10	202	0,61
pyrène	fluoranthène-d10	202	0,68
benzo[a]anthracène	chrysène-d12	228	0,90
triphenylène + chrysène	chrysène-d12	228	0,63
benzo[b,j,k]fluoranthène	benzo[e]pyrène-d12	252	1,55
benzo[e]pyrène	benzo[e]pyrène-d12	252	1,22
benzo[a]pyrène	benzo[a]pyrène-d12	252	2,44
pérylène	benzo[e]pyrène-d12	252	3,41
indeno(1,2,3-cd)pyrène	benzo[g,h,i]pérylène-d12	276	3,41
dibenzo[a,h]anthracène	benzo[g,h,i]pérylène-d12	276	1,55
benzo[g,h,i]pérylène	benzo[g,h,i]pérylène-d12	278	3,41

## 2. Analyses non ciblées : la notion d'empreinte chromatographique

Cette analyse consiste à analyser l'échantillon en GC-MS en mode balayage (full-scan) contrairement aux analyses ciblées où la détection est en mode SIM (Selected ion monitoring). Dans ce type d'analyse, une gamme de masses est suivie (m/z) afin de détecter les fragments des composés présents dans l'extrait dans cette fourchette de masses pendant une période de temps définie. Généralement la gamme de masses est comprise entre 35 et 500 m/z. Cette analyse en inconnu n'a pas pour but l'identification de composés du fait de la complexité de l'extrait comme c'est le cas après fractionnement et analyse en GC-Q/ToF et LC-Q/ToF des fractions biologiquement actives (pour plus d'explications, voir VII. Analyse

chimiques des fractions positives pour l'identification des composés biologiquement actifs). Elle sert essentiellement à comparer les profils chromatographiques de chaque sol afin d'observer si les extraits possèdent des caractéristiques communes ou radicalement différentes. Cette analyse couplée aux bioessais et aux analyses chimiques ciblées sur l'extrait « brut » permet de confirmer le choix du sol ou des sols qui doivent être fractionnés.

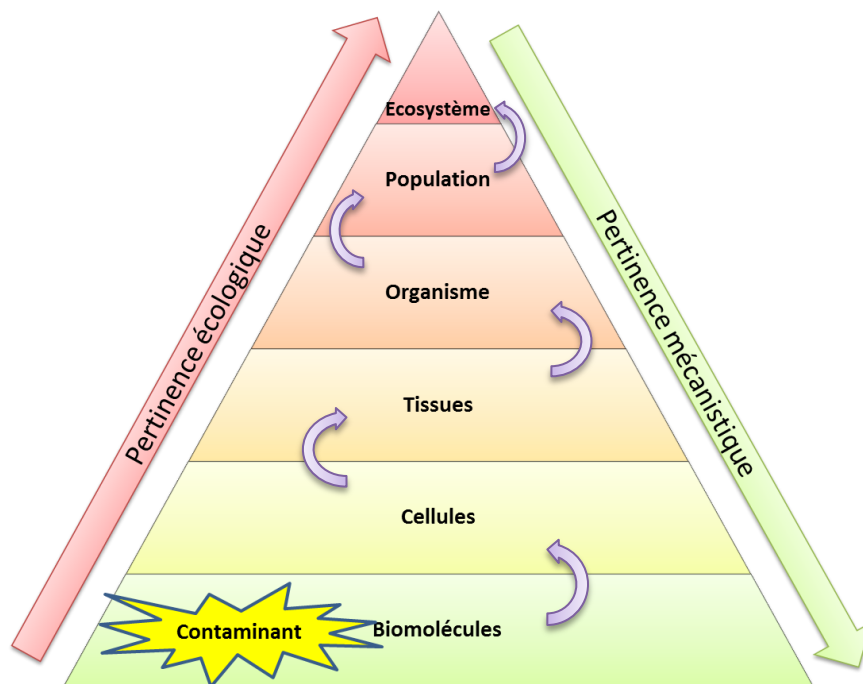
**Tableau 23** : Paramètres d'analyse par GC-MS (GC série 6890 et détecteur, série 5973, Agilent technologies, Waghauseel, Germany) pour l'analyse en mode « inconnu » des échantillons et une comparaison d'empreintes chromatographiques.

Eléments	Paramètres
Colonne	HP5-MS (Agilent technologies, Massy, France) 5 % Phényle- 95 % Méthyl siloxane (30 m x 250 µm x 0,25 µm)
Source / énergie	Impact électronique / 70 ev
Mode d'injection/Température/débit de purge	Sans division pulsé (25 psi) / 280°C /60 mL.min <sup>-1</sup> pendant 1,5 min
Volume d'injection	1 µL (Isooctane ou Dichloromethane)
Gaz vecteur	Hélium (99.9996%)
Débit	1,3 mL.min <sup>-1</sup>
Gradient de température	50°C pendant 2 min, 5°C.min <sup>-1</sup> jusqu'à 310°C maintenu durant 15 min
Temps d'acquisition	69 min
Paramètres de scan	Masse minimale : 50 m/z ; Masse maximale : 350 m/z

### 3. Analyses biologiques

Les analyses biologiques permettent de vérifier si la contamination des sols étudiés pourrait présenter des effets délétères sur les êtres vivants. Une fois dans l'environnement, un contaminant peut pénétrer dans les organismes et entrer en interaction avec les constituants cellulaires. Les impacts d'un contaminant au niveau biomoléculaire se traduisent par une réponse cellulaire à une petite échelle et dans un court laps de temps, cependant cela peut impliquer des milliers de biomolécules (ex : gènes, protéines...). Ceci peut modifier l'homéostasie cellulaire et se répercuter à long terme sur les niveaux supérieurs d'organisation biologique si les effets du contaminant ne sont pas compensés par des mécanismes de protection cellulaires (Figure 24).





**Figure 24** : Cadre conceptuel de l'écotoxicologie d'un contaminant chimique (d'après Schirmer et al., 2010 et Snape et al., 2004)

Les études ecotoxicologiques impliquent l'utilisation d'outils qui peuvent se situer aux différents niveaux écologiques. Il est ainsi possible de distinguer les bioessais *in vivo* et *in vitro*.

### 3.1. Les outils *in vivo*

Ces outils consistent à utiliser des êtres vivants entiers afin de mesurer les effets de la contamination au niveau des organismes. Les expériences *in vivo* sont effectuées de deux façons :

- In situ où les effets de la contamination sont mesurés sur des individus présents dans le lieu d'études. Il est possible dans ce cas de faire des études du bon état écologique d'un écosystème en suivant des espèces bio indicatrices. Il est également possible d'étudier des biomarqueurs afin de mesurer l'impact observable et/ou mesurable de la contamination au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire et physiologique (Lagadic et al., 1997).
- Ex situ où les effets de la contamination sur les individus sont étudiés dans des conditions contrôlées en laboratoire.

Une majorité de bioessais en écologie terrestre impliquent l'utilisation de la matrice et non d'extraits pour l'étude de la contamination des sols (Thibaut, 1998). De ce fait, ces bioessais ne sont pas compatibles avec une analyse dirigée par l'effet qui implique l'utilisation d'extraits de sol. Ils possèdent cependant certains avantages et inconvénients dont il faut avoir conscience. Avec les bioessais *in vivo*, il est possible d'étudier l'effet d'un contaminant à l'échelle d'un organisme mais aussi de s'intéresser aux niveaux écologiques se situant en dessous de l'organisme, ils présentent l'avantage d'être intégratifs. Par contre, ils demandent l'utilisation d'animaux entiers ce qui est, d'un point de vue éthique de moins en moins

accepté par notre société (règle des 3R) et de plus en plus limité par la réglementation (ex : Règlement (CE) N° 1223/2009 du parlement européen et du conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques qui interdit depuis 2013 la vente de cosmétiques qui ont fait l'objet d'expériences animales). De plus, ils nécessitent l'entretien d'êtres vivants ce qui implique des contraintes logistiques (encagement, soin des animaux...) ainsi que l'utilisation d'une quantité plus importante d'échantillon (matrice ou extraits) influençant le criblage et limitant son haut débit. Enfin, il est difficile dans une approche d'identification de composés actifs de trouver le contaminant responsable de l'impact biologique d'un mélange du fait d'actions multiples et non spécifiques.

### **3.2. Les outils *in vitro***

Les tests *in vitro* sont basés sur l'utilisation d'une composante d'un organisme isolée de son contexte biologique naturel. Ces bioessais emploient généralement des cellules isolées à partir d'un organe sain (i.e. culture primaire) ou de tumeurs et immortalisées par l'ajout d'un oncogène ou par une mutation d'un gène impliqué dans le cycle cellulaire (i.e. lignées cellulaires). Ces tests consistent à exposer des cellules de culture primaire ou de lignées au(x) contaminant(s) qui va/vont pouvoir agir sur des mécanismes d'action qui lui/leur sont spécifiques. Ils sont ainsi utiles pour étudier le mécanisme d'action des effets d'un contaminant, évaluer les effets de mélange et mettre en évidence des interactions potentielles entre certaines voies de signalisation. Toutefois, il faut garder à l'esprit qu'il s'agit de systèmes simplifiés ne reflétant pas forcément l'effet possible d'un contaminant à l'échelle globale de l'individu.

Ces outils *in vitro* sont souvent utilisés en EDA du fait de leur rapidité, de leur sensibilité et de la possibilité de travailler en petits volumes.

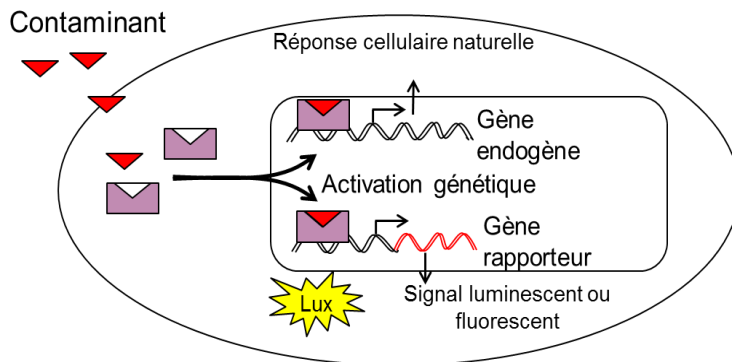
#### **3.2.1. Les outils *in vitro* impliquant les récepteurs nucléaires**

Les bioessais *in vitro* utilisés en EDA impliquent majoritairement la superfamille des récepteurs nucléaires qui se lient aux xénobiotiques. Cette famille de récepteurs est appelée ainsi du fait d'un mode d'action commun. Après la liaison d'un ligand spécifique, leur conformation structurelle est modifiée et le récepteur (souvent après dimérisation avec un modulateur) est transféré dans le noyau, se lie à l'élément de réponse correspondant à l'ADN et déclenche l'expression du gène (Janosek et al., 2006). Il existe actuellement 48 récepteurs nucléaires connus qui sont regroupés en trois classes en fonction des ligands s'y fixant (Jacobs et al., 2003) :

- Type I qui lient les hormones stéroïdiennes : les récepteurs de la progestérone (PR), des œstrogènes (ER), des androgènes (AR), des glucocorticoïdes (GR) et minéralocorticoïdes (MR),
- Les récepteurs de Type II : les récepteurs des hormones thyroïdiennes (TR), de la vitamine D (VDR), des rétinoïdes en général (RXR) et de l'acide all-trans-rétinoïque (RAR) et des proliférateurs activés des peroxyosomes (PPAR)
- Les récepteurs de Type III appelés récepteurs orphelins dont aucun ligand n'a pas été à ce jour identifié, ou qui potentiellement ne possèdent pas de ligands naturels ou encore dont la fonction n'a pas été élucidée tels que le pregnane-X-récepteur (PXR) ou le récepteur constitutif des androstanes (CAR).

Du fait de la simplicité d'associer une structure à la réponse biologique observée lors des bioessais impliquant les récepteurs nucléaires, ceux-ci sont très utilisés en EDA. En mettant un gène rapporteur sous contrôle du promoteur possédant les éléments de réponses

spécifiques au récepteur nucléaire, il est possible de mesurer l'activité du contaminant et sa liaison au récepteur nucléaire. Lors de la fixation du contaminant au récepteur, ceci va entraîner une cascade de signalisation et permettre la transcription du gène rapporteur qui produit une protéine possédant une caractéristique observable en laboratoire (fluorescence, activité enzymatique détectable ; Figure 25). La réponse observable est alors dépendante de l'affinité du ligand avec le récepteur ainsi que de la concentration des molécules inductrices. Il est également possible d'utiliser un gène endogène aux cellules témoignant de la présence du contaminant. Il ne doit cependant pas être transcrit constitutivement (être inducible par une molécule endogène ; Eggen and Segner, 2003).



**Figure 25 :** Principe de l'utilisation d'un gène rapporteur. Le contaminant se fixe à un récepteur cellulaire, ce qui entraîne une cascade de signalisation et la production d'une protéine qui est mesurable.

Ces récepteurs sont étudiés lors des analyses biologiques car ils correspondent au premier niveau d'action des contaminants sur les organismes, sont spécifiques et permettent une identification plus simplifiée des ligands interagissant via ces récepteurs. L'Ineris a écrit un rapport en 2009 (Aït-Aïssa, 2009) qui résume très bien le type de contaminants qui peuvent être détectés grâce aux différents récepteurs nucléaires (Tableau 24). Il est à noter que le récepteur des hydrocarbures (AhR) présent dans le Tableau 24 ne fait pas partie des récepteurs nucléaires mais appartient à la famille des facteurs de transcription de base hélice-boucle-hélice (structure tridimensionnelle de la protéine). Cependant son fonctionnement est similaire et il peut tout comme les récepteurs nucléaires lier des xénobiotiques permettant ainsi l'identification de composés biologiquement actifs.

Bien qu'il soit intéressant de réaliser différents bioessais afin de pouvoir identifier un maximum de contaminants biologiquement actifs, un choix a dû être réalisé lors de ce travail car il est impossible de multiplier leur nombre du fait du temps nécessaire et de l'investissement financier que demande la réalisation d'un panel de bioessais. Un choix a donc été effectué afin d'en sélectionner certains à appliquer dans cette étude, il a été motivé par l'historique de contamination des sites étudiés et des recherches bibliographiques des études environnementales impliquant une approche EDA. Le choix s'est porté sur l'activité AhR et ER du fait de leur utilisation régulière en EDA (Brack et al. 2005 ; Houtman et al. 2006 ; Grung et al. 2007 ; Oh et al. 2009 ; Wölz et al. 2010 ; Schmitt et al. 2011 ; Regueiro et al. 2013). Le test impliquant l'activité AhR reste la plus intéressante du fait de l'historique de contamination des sites d'étude (contamination avec la présence de composés aromatiques polycycliques).

**Tableau 24** : Exemple de récepteurs cibles et de ligands naturels, synthétiques et xénobiotiques (Issu d' Aït-Aïssa, 2009)

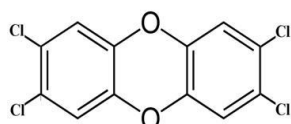
Récepteur	Ligands naturels ou synthétiques	Polluants d'origine industrielle, urbaine ou agricole (exemples)
Récepteur des oestrogènes (ER)	17b-estradiol, estrone, phyto-oestrogènes, mycooestrogènes, 17a-ethynylestradiol	Pesticides organochlorés, alkylphénols, bisphénol A, phtalates, parabènes, benzophénones (filtres anti-UV), hydroxy-PCB, ...
Récepteur des hydrocarbures (AhR)	HAPs, amines aromatiques	Dioxines, furanes, PCB plans, HAPs, imidazoles...
Récepteur des androgènes (AR)	Testostérone, 5-dihydroxytestostérone	Pesticides : vinclozoline, DDT et métabolites, alkylphénols, benzophénones, bisphénolA...
Récepteur des pregnanes (PXR)	Pregnénolone, RU486, stéroïdes	Pesticides, PCB hyperchlorés, carbamazepine, PBDE, pharmaceutiques...
Récepteur des Glucocorticoïdes (GR)	Cortisole, dexamethasone, pharmaceutiques	Inconnu
Récepteurs des activateurs de prolifération des peroxysomes (PPARs)	Acides gras	Perfluorés, Phtalates, phényls étain, PBDE

### 3.2.2. Les outils in vitro impliquant les récepteurs nucléaires utilisés dans cette étude : Choix des lignées, entretien et déroulement des bioessais

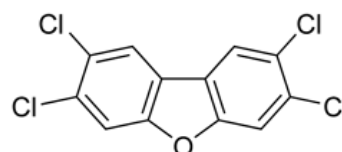
Les bioessais employés ont servi à tester les extraits bruts lors de l'analyse préliminaire. Les démarches des bioessais présentées ici sont les mêmes que ce soit pour tester un extrait, une fraction ou un composé pur.

#### 3.2.2.1. L'activité AhR a) Généralités

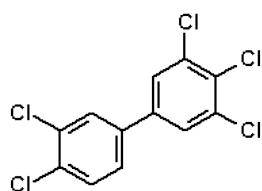
Le récepteur des hydrocarbures (AhR ou récepteur Ah) est une protéine qui chez l'homme est codée par le gène AhR. Ce récepteur est un facteur de transcription activé par un ligand impliqué dans la régulation des réponses biologiques à des hydrocarbures aromatiques planaires (Dioxine, PCB, furane et HAP ; Figure 26). Il régule les enzymes métabolisant les xénobiotiques, tels que le cytochrome P450. Son action se situe donc essentiellement au niveau du foie mais aussi au niveau de l'intestin, des reins et des branchies chez le poisson (Whyte and Tillitt. 2001).



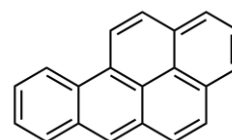
(A) 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine



(B) 2,3,7,8-tétrachlorodibenzofurane



(C) 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphényle (PCB 126)

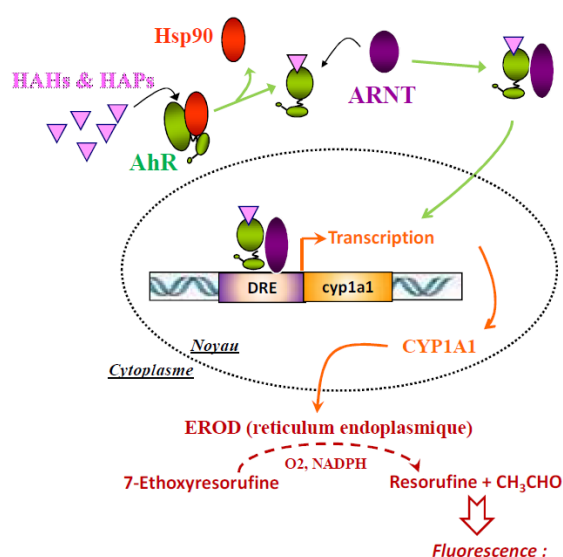


(D) Benzo(a)pyrène

**Figure 26** : Ligands représentatifs du récepteur Ah. Les molécules montrent la structure générale de composés dans les classes suivantes: (A) dibenzo-p-dioxines (PCDD), (B) polychlorodibenzofuranes (PCDF), (C) biphényles polychlorés (PCB) et (D) hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).

Comme précisé avant dans ce document, il fait partie de la famille des facteurs de transcription de base hélice-boucle-hélice. Le récepteur Ah lie plusieurs ligands exogènes tels que les flavonoïdes naturels de plantes, les polyphénols et les indoles, ainsi que des hydrocarbures aromatiques polycycliques et les composés synthétiques de type dioxine. Le récepteur Ah est un facteur de transcription cytosolique qui est inactif en l'absence de ligands exogènes et lié à plusieurs co-chaperons tel que Hsp90, XAP2 et P23. Avec fixation du ligand tels que la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD), les chaperons se dissocient du complexe entraînant sa translocation dans le noyau puis la dimérisation du complexe AhR/ligand avec la protéine ARNT où ce complexe va pouvoir se fixer à leur élément de réponse (ex : DRE, dioxin responsive element) et agir sur la transcription des gènes cibles. Il est à noter que sa fonction principale est l'adaptation de l'organisme à l'afflux de xénobiotiques puisqu'il est responsable de l'induction de systèmes enzymatiques permettant leur élimination (ex : cytochromes) (Hahn, 2002).

Le bioessai consiste à mesurer l'activité du cytochrome P450 1A1 dont le gène est naturellement présent au sein des cellules et dont la transcription est induite par les ligands exogènes (xénobiotiques). Après exposition des cellules pendant un temps donné à l'extrait, la fraction ou un composé, elles sont mises en présence de 7-Ethoxyresorufine qui est dégradée en resorufine par le cytochrome 1A1 alors produit (activité 7-éthoxyresorufine o-dééthylase) et entraîne une fluorescence mesurable (Figure 27).



**Figure 27** : Voie d'activation du récepteur Ah et de mesure de l'activité EROD (Issu de Creusot, 2011)

b) Les lignées cellulaires associées à cette activité

L'activité AhR peut être mesurée en utilisant différentes lignées cellulaires. Les lignées proviennent de différents organismes modèles et peuvent présenter une sensibilité variable lors des bioessais. Ces lignées doivent donc être testées afin de choisir la plus sensible pour la détection des contaminants responsables de l'activité AhR des sols étudiés.

La sensibilité et la spécificité du bioessai est un élément important à prendre en compte afin d'identifier le plus possible de contaminants étant responsables de la réponse biologique. Cependant d'autres critères doivent aussi entrer en ligne de compte comme la facilité de culture de la lignée cellulaire et sa réponse face à des mélanges complexes.

**Tableau 25** : Listing des lignées cellulaires couramment utilisées pour mesurer l'activité AhR

Nom de la lignée	Organisme d'origine	Limite de détection pour la TCDD	Sources
<b>RTL-W1</b>	Oncorhynchus mykiss (truite arc-en-ciel)	<1 pM	Hahn 2002 Whyte et al. 2004 Whyte et al. 2001 Denison et al. 2004
<b>PLHC-1</b>	Poeciliopsis lucida	0.48 pM	Hahn 2002 Whyte et al. 2004 Whyte et al. 2001
<b>H4IIE</b>	Rat	0.19-0.68 pM	Hahn 2002 Whyte et al. 2004 Whyte et al. 2001
<b>HEPG2</b>	Humain	16 pM	Wiebel et al. 1996 Hahn 2002 Whyte et al. 2004 Whyte et al. 2001

Le Tableau 25 présente les lignées les plus couramment utilisées pour la mesure de l'activité AhR. Selon ce Tableau, les lignées les plus intéressantes du point de vu de la sensibilité, pour l'identification des polluants sont les lignées RTL-W1, PLHC1 et H4IIE. La lignée HEPG2 est de loin la moins sensibles elle est donc à écarter pour l'étude environnementale du fait de la faible interaction des polluants avec son récepteur Ah. Cette lignée est intéressante si le but de l'étude se porte essentiellement sur les risques pour la santé humaine (Wiebel et al. 1996).

La lignée cellulaire RTL-W1, bien que sa sensibilité soit bonne, peut induire une réponse AhR uniquement par un changement de milieu de culture sans ajout de polluant du fait de la présence de tryptophane (Segner et al. 2000) et donc être à l'origine de faux positifs. RTL-W1 ne semble donc pas être la lignée la plus adaptée pour la détection de l'activité dioxin-like des mélanges étudiés ici du fait de leur complexité.

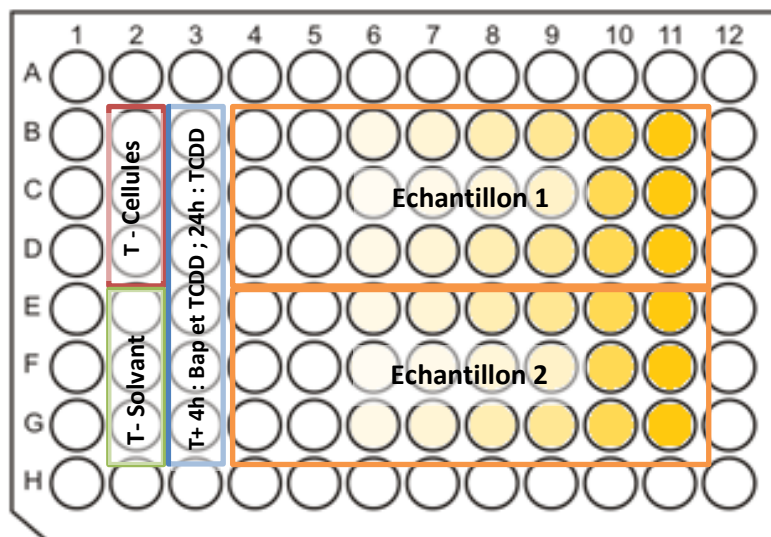
Pour ces raisons, seulement les lignées de poisson PLHC-1 et de rat H4IIE ont été testées pour identifier la plus intéressante à utiliser par la suite. En effet les données de la littérature indiquent qu'elles ont une sensibilité similaire (limite de détection de la TCDD de 0,48 pM pour PLHC-1 et de 0.19-0.68 pM pour H4IIE). Cependant des contradictions existent. Villeneuve et al. (2001) ont également testé ces lignées sur des mélanges de polychlorés (PCN), de biphényles polychlorés (PCB) et d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ; ils ont ainsi montré que la lignée H4IIE était plus sensible pour l'étude de mélanges complexes que la lignée PLHC-1.

### c) Entretien de la lignée et déroulement du bioessai

La lignée choisie pour l'ensemble de l'étude a finalement été la lignée PLHC-1 (voir la partie résultats : test des lignées cellulaires). Voici comment cette dernière a été entretenue et comment se sont déroulés les bioessais.

**Entretien :** Pour la lignée PLHC-1, la culture s'effectue en flasques de 75 cm<sup>3</sup> dans du milieu de culture minimum (Eagle's minimal essential medium, E-MEM) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) ainsi que 1 % d'acides aminés non essentiels et d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine). Leur croissance se réalise à 30°C sous atmosphère humide possédant 5 % de CO<sub>2</sub>. Le milieu est changé tous les 2 ou 3 jours. Une fois leur confluence arrivée à 80%, les cellules sont détachées afin d'ensemencer une nouvelle flasque de culture et des plaques de 96 puits pour les bioessais. Les cellules sontensemencées dans des plaques transparentes (plaque TPP®, D. Dutcher, Brumath, France) afin d'obtenir 50 000 cellules par puits.

**Déroulement du bioessai :** Dans chaque puit la quantité de solvant (DMSO) ne doit pas excéder 0,5 % ; pour cela chaque élément déposé (*ex* : *extrait, fraction, composé*) est dilué dans du milieu de culture de sorte que le volume final soit de 150µL/puits. Afin d'obtenir une courbe dose-réponse, chaque élément est déposé selon une gamme de concentrations pour déterminer la concentration efficace à 20% par rapport au témoin positif (témoin TCDD) si l'induction est suffisante. Les plaques sont toujours effectuées selon un schéma précis qui contient obligatoirement un témoin cellulaire afin de vérifier le niveau basal de l'activité observée et selon le temps d'incubation, les témoins positifs suivants : témoins positif à la TCDD (à une concentration de  $3,22 \cdot 10^{-7}$  g/L) et au BaP (à une concentration de  $2,52 \cdot 10^{-4}$  g/L) (Figure 28). La lignée PLHC-1 est incubée 4h ou 24h pour mettre en évidence les composés persistants (*ex* : dioxines) et ceux qui sont métabolisables (*ex* : HAP) (Louiz et al., 2008; Kinani et al., 2010; Creusot et al., 2013).



**Figure 28 :** Schéma d'une plaque lors d'un bioessai impliquant la mesure d'une activité AhR. Le test s'accompagne toujours des deux témoins négatifs : cellulaire et solvant. Les témoins positifs utilisés sont la TCDD (4h et 24h) à une concentration de  $3,22 \cdot 10^{-7}$  g/L et le BaP (4h) à une concentration de  $2,52 \cdot 10^{-4}$  g/L. Chaque dépôt est réalisé en triplicat et les gammes d'échantillons sont composées de 4 à 8 points différents.

Afin de mesurer l'activité AhR induite, après 4h ou 24h d'incubation, les plaques sont vidées de leur milieu de culture par retournement et 100µL de PBS contenant de la 7-éthoxyrésorufine (7 µM), sont ensuite ajoutés. L'activité AhR est alors mesurée par un spectrofluorimètre (Sinergy 2, Biotek®, Colmar, France) selon les paramètres présentés dans le Tableau 26. Le signal obtenu pour les puits du bord de la plaque sert à déterminer le bruit de fond de la lecture.

**Tableau 26** : Paramètres de lecture des microplaques lors du bioessai impliquant l'activité AhR

Paramètre	Valeur
Température	30°C
Temps de mesure	10 minutes (cinétique)
Longueur d'onde d'excitation	530 ± 25
Longueur d'onde d'émission	590 ± 35
Optique	Lecture par le dessous avec un gain de 50
Rapidité de lecture	Normale avec un délai de 100 msec

Les courbes dose-réponses sont modélisées en suivant l'équation de Hill à l'aide du logiciel Microsoft Excel® en utilisant la macro REGTOX\_EV7.0.5 version 2 disponible librement sur le site [http://www.normalesup.org/~vindimian/fr\\_index.html](http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html) (Vindimian et al., 1983). Ces représentations permettent de déterminer la concentration entraînant 20 % de l'activité par rapport au témoin positif de la TCDD (EC 20).

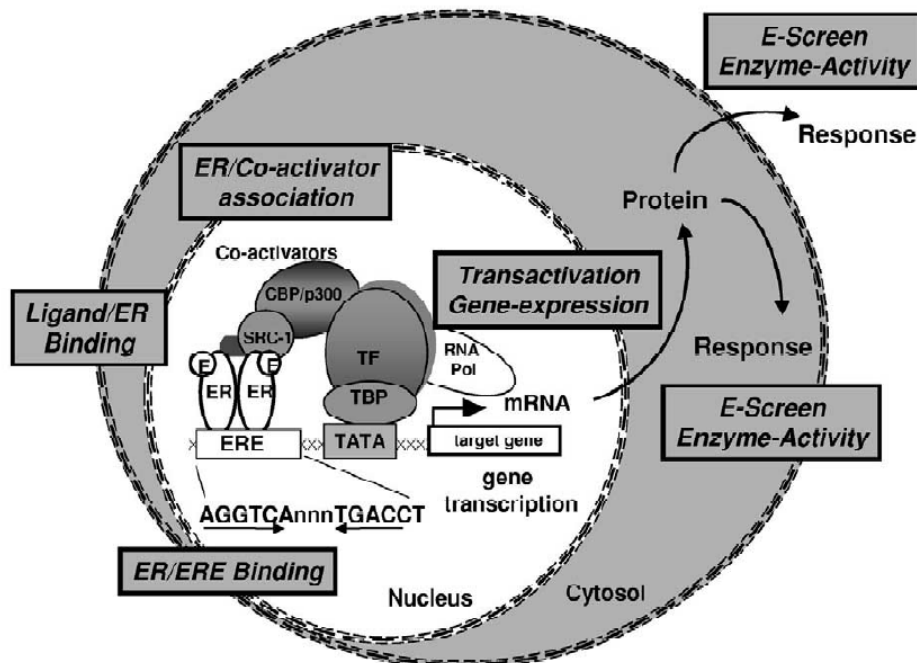
#### 3.2.2.2. L'activité ER

##### a) Généralités

Les récepteurs des œstrogènes sont des récepteurs exprimés dans des tissus spécifiques et qui lient naturellement les œstrogènes qui sont les principales hormones stéroïdes sexuelles féminines telles l'oestradiol (E2) ou l'estrone (E1). Elles régulent un ensemble de processus reproductifs, développementaux, comportementaux et physiologiques dans l'organisme.

Il existe plusieurs formes de récepteurs des œstrogènes que sont le ER $\alpha$  et le ER $\beta$  agissant dans des tissus spécifiques et ayant des rôles physiologiques distincts. Cependant leur mécanisme d'action est similaire. Après pénétration du ligand dans la cellule et liaison au récepteur, celui-ci s'associe en dimère (homodimère ou hétérodimère) afin de se fixer sur son élément de réponse nommée ERE (estrogen reponse element) et induire la transcription des gènes sous le contrôle de ce promoteur (Moggs et Orphanides, 2001. Mueller, 2002) (Figure 29).





**Figure 29** : Mécanisme d'action des récepteurs des œstrogènes (Mueller, 2002)

Les xénobiotiques en interagissant avec les récepteurs nucléaires stéroïdiens sont considérés comme des perturbateurs endocriniens et peuvent causer des anomalies physiologiques et de reproduction. C'est pourquoi les bioessais impliquant ce récepteur, sont très utilisés en EDA. L'un des plus connus comme oestrogénomimétique est le bisphénol A (Vom Saal et al. 2012).

Pour la détection des ligands aux récepteurs des œstrogènes, la lignée utilisée est la lignée MCF-7 issue de cellules cancéreuses du sein humain ayant été transfectées de manière stable avec le gène codant pour la luciférase et sous le contrôle du promoteur liant le récepteur des oestrogènes  $\alpha$  (Era ; Balaguer et al. 1999). Ces cellules appelées MELN ont été fournies par Patrick Balaguer de l'Inserm de Montpellier.

b) Entretien de la lignée et déroulement du bioessai

**Entretien** : La culture s'effectue en flasques de 75 cm<sup>3</sup> dans du milieu de culture (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, DMEM) supplémenté avec 10 % SVF ainsi que 1 % d'acides aminés non essentiels et d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine). Leur croissance se réalise à 37°C sous atmosphère humide possédant 5 % de CO<sub>2</sub>. Le milieu est changé tous les 2 ou 3 jours. Une fois leur confluence arrivée à 80%, le milieu est remplacé par du DMEM sans rouge de phénol contenant 3 % de SVF déstéroïdé et 1 % antibiotiques deux à trois jours avant la réalisation des tests afin d'éliminer le rouge de phénol et le SVF qui ont une activité hormonale. Après incubation, les cellules sontensemencées dans des plaques blanches de 96 puits (CellStar®, Greiner Bio-one, D. Dutcher, Brumath, France) à une densité de 1.10<sup>5</sup> cellules par puit.

**Déroulement du bioessai** : L'exposition des cellules se déroule de la même manière que pour les cellules PLHC-1 si ce n'est que le témoin positif est le 17 $\beta$ -œstradiol (E2) à une concentration de 3\*10<sup>-6</sup> g/l. La lignée MELN est ensuite incubée pendant 16h avant lecture. Afin de mesurer l'activité œstrogénique, après les 16h d'incubation, les plaques sont vidées de

leur milieu de culture par retournement et 50µL de PBS contenant de la luciférine (0,3 mM) sont ensuite ajoutés. Un complexe luciférase/luciférine se forme alors et catalyse la réaction d'oxydation de la luciférine par le dioxygène (O<sub>2</sub>). Cette dernière devient instable et émet un photon. Le signal luminescent est mesuré par un luminomètre (Sinergy 2, Biotek®, Colmar, France) selon les paramètres présentés dans le Tableau 27. Le signal obtenu pour les puits du bord de la plaque sert à déterminer le bruit de fond de la lecture.

**Tableau 27** : Paramètres de lecture des microplaques lors du bioessai impliquant l'activité ER/Luciférase

Paramètre	Valeur
Température	37°C
Temps de mesure	2 minutes
Type de mesure	Luminescence
Optique	Lecture par le dessus avec un gain de 135
Rapidité de lecture	Normale avec un délai de 100 msec

Enfin tout comme l'activité AhR, Les courbes dose-réponse sont modélisées en suivant l'équation de Hill et les EC<sub>20</sub> déterminées par rapport au témoin positif de l'E2.

### 3.2.2.3. Le test du MTT

Ce test a été effectué sur l'ensemble des extraits bruts testés sur les deux lignées cellulaires. Il renseigne, par une mesure de colorimétrie, sur l'activité métabolique des cellules. Dans le principe, du bromure tétrazolium de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétranasodium (MTT) est mis en contact avec les cellules. Chez les cellules vivantes, la succinate déshydrogénase présente chez les mitochondries va réduire le MTT en formazan. La réaction forme alors des cristaux violets. La coloration est plus ou moins intense suivant la quantité de cellules actives.

Ce test a été effectué en complément des bioessais mesurant l'activité AhR et ER. Le test MTT est décrit en détail par Laville et al. (2004). Afin d'effectuer ce test, les cellules ont été préalablement déposées sur des plaques 96 puits transparentes (TPP®, D. Dutcher, Brumath, France) et exposées durant 24h aux extraits testés. Après incubation, les plaques sont vidées et 100 µL de MTT dilué dans du milieu de culture sont ajoutés à une concentration de 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> dans chaque puit. Les cellules sont laissées à incuber pendant 3h. Après l'incubation, les plaques sont délicatement vidées et 100 µL de DMSO est ajouté dans chaque puit. Après une agitation de 30 min à 300 rpm, les plaques sont lues par spectrométrie (Sinergy 2, Biotek®, Colmar, France) aux longueurs d'onde de 570 nm et 660 nm. La viabilité cellulaire est exprimée en pourcentage par rapport à la valeur du contrôle.

### 3.3. Les autres tests in vitro utilisés lors de l'étude

D'autres bioessais in vitro ont été testés afin de vérifier leur compatibilité avec la démarche et l'étude de la contamination des sols. Le premier est le test de génotoxicité SOS-Chromotest qui a déjà montré son efficacité pour identifier des substances et des extraits environnementaux génotoxiques (Quillardet et al. 1985 ; Mamber et al. 1986 ; Hofnung et al. 1989 ; Dutka et al. 1995 ; Janz et al. 1990 ; Langevin et al. 1992 ; Nylund et al. 1992). Ce bioessai a été sélectionné du fait de la contamination aux HAP du site A et de la génotoxicité potentielle des sols. Les deux autres bioessais sont des tests de toxicité aigüe sur la bactérie *Vibrio Fischeri* (test du Microtox®) et sur la micro algue *Pseudokirchneriella subcapitata*. Ces

deux bioessais sont employés en EDA mais uniquement sur les matrices liquides (Reemtsma et al. 1999 ; Reineke et al. 2002 ; Hartnik et al. 2007 ; Schulze et al. 2010).

Après des essais préliminaires sur les extraits bruts, l'ensemble de ces bioessais n'ont pas été retenus pour la suite de la démarche pour différentes raisons qui seront expliquées dans la partie résultats.

### **3.3.1. Test de génotoxicité : Le SOS-Chromotest**

Ce test implique le système de réparation de l'ADN appelé SOS qui est mis en place lors des dommages à l'ADN par des substances génotoxiques. Le SOS Chromotest permet de déterminer in vitro la capacité d'un composé ou d'un extrait environnemental à induire l'expression des composants du système SOS dans la souche bactérienne génétiquement modifiée Escherichia Coli PQ 37 (Quillardet et al., 1982; Quillardet et al., 1985). En cas de dommages à l'ADN provoqués par un composé génotoxique, cette bactérie enclenche un ensemble de mécanismes permettant de réparer son ADN comme la transcription du gène *sfiA*. Cependant cette bactérie possède également le gène rapporteur de la  $\beta$ -galactosidase sous le contrôle du promoteur du gène *sfiA*. Plus les dommages sont importants plus le gène *lacZ* (gène de la  $\beta$ -galactosidase) est induit et plus l'activité de l'enzyme  $\beta$ -galactosidase est élevée. Une seconde enzyme, la phosphatase alcaline, permet de tenir compte des effets cytotoxiques des composés testés. Ces enzymes sont facilement quantifiables en présence de réactifs. Leurs activités sont mesurées par colorimétrie (Densité Optique ou DO) à 420 nm. Ces mesures permettent de calculer un facteur d'induction (IF) du composé ou de l'extrait testé en déterminant le rapport entre la DO obtenue par la  $\beta$ -galactosidase et celle de la phosphatase alcaline et en le rapportant à celui du témoin solvant. Pour qu'un extrait soit considéré comme génotoxique, il faut que le facteur d'induction soit supérieur à 1,5 ; la DO de la  $\beta$ -galactosidase doit augmenter par rapport au témoin ; une relation dose/effet entre le facteur d'induction et la concentration doit être observable et les résultats doivent être reproductibles (Le Curieux et al., 1995).

Certains composés peuvent présenter une génotoxicité après avoir subi une métabolisation hépatique. Afin d'observer le potentiel génotoxique de ces composés, ils sont bioactivés grâce à une suspension de foie appelé S9 contenant l'ensemble des constituants permettant leur biotransformation et l'étude du potentiel génotoxique de ces molécules.

Ce test a été effectué dans l'entreprise Toxem au Havre (<http://www.toxem.com>).

### **3.3.2. Les tests de toxicité aigüe : Le microtox et l'inhibition de croissance algale de *Pseudokirschnerilla Subcapitata***

Microtox® : Ce test consiste à utiliser la bactérie marine bioluminescente (*Vibrio fischeri*) comme organisme d'essai. Les bactéries sont exposées à une gamme de concentrations de l'extrait qui a été préalablement suspendu dans du diméthylsulfoxyde (DMSO). La réduction de l'intensité de la lumière émise à partir des bactéries est mesurée avec des solutions standards et des échantillons de contrôle. La variation de la production de lumière et la concentration de l'extrait ou du composé testé permettent d'obtenir une courbe dose/réponse et de déterminer une concentration inhibitrice à un pourcentage donné en fonction du témoin contrôle (CI). Pour le test réalisé, l'CI20 a été utilisée et obtenue après une exposition de 30 minutes. Ce test a été réalisé selon la norme européenne NF EN ISO 11348-3.

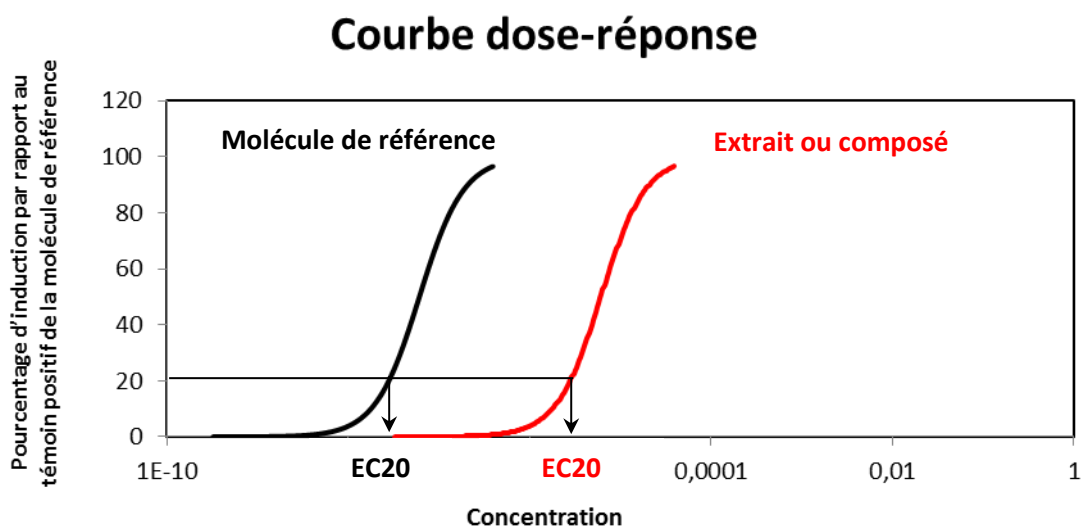
Test d'inhibition de la croissance algale de *Pseudokirschnerilla subcapitata* : ce bioessai est basé sur l'inhibition de la croissance de la population algale et consiste à effectuer plusieurs dilutions de l'extrait (dans le DMSO) afin de mesurer la densité cellulaire après trois jours

d'exposition dans des conditions contrôlées. L'essai consiste à déterminer la concentration de l'échantillon qui cause une réduction de 20 % de la croissance de la population algale, après une période d'exposition de 72 heures (CI20 72h) afin de déterminer une relation dose-réponse. L'incubation est effectuée dans un système statique (sans renouvellement) et dans des conditions contrôlées de température et de lumière. L'effet d'inhibition est mesuré par la détermination de la densité cellulaire. Ce test a été réalisé selon la norme européenne NF EN ISO 8692 et la ligne directrice OCDE 201.

#### 4. Equilibre des masses : Lien entre les analyses chimiques et biologiques

Afin d'évaluer si l'activité biologique d'un extrait ou d'une fraction peut être expliquée par les composés analysés lors des analyses chimiques, il est nécessaire de vérifier la contribution des composés identifiés à l'activité biologique observée. Et ainsi savoir si les investigations ont besoin d'être plus poussées ou non dans les extraits ou les fractions répondant aux bioessais.

Pour cela, une étude d'équilibre des masses (MBA) impliquant l'utilisation des facteurs d'équivalent toxique (TEF ou REP) et se basant sur un modèle d'additivité des effets a été utilisée. Elle permet de convertir la concentration d'un composé en une valeur d'activité biologique (Khim et al. 2001 ; Nicolas Creusot 2011 ; Holbrook 2002).



**Figure 30** : Représentation des courbes dose-réponse obtenues lors des bioessais pour les extraits ou les composés purs.

Les molécules de références sont pour le bioessai AhR, la TCDD et le BaP pour la lecture à 4h et uniquement la TCDD pour les lectures à 24h. Pour l'activité œstrogénique, la molécule de référence est la 17 $\beta$ -oestradiol (E2). Ces courbes permettent de déterminer les TEQ-bio des extraits et fractions ainsi que les facteurs d'équivalent toxique des composés. EC20 : Concentration efficace à 20%.

#### Principe de la MBA :

La vérification de la contribution des composés à l'activité biologique d'un extrait est possible en mesurant l'activité biologique de l'extrait environnemental (TEQ-bio) et en la comparant à l'activité biologique théorique qui devrait être obtenue pour les polluants identifiés lors de l'analyse chimique (TEQ-chim). Si ces deux activités sont identiques ou très proches alors l'ensemble des polluants identifiés expliquent l'activité observée lors des bioessais.

**Calcul de la TEQ-bio** : La TEQ-bio correspond à l'équivalent toxique biologique d'un extrait. Elle est obtenue en déterminant la courbe dose-réponse de l'extrait et en la comparant à celle d'un composé de référence (Figure 30). Il est ainsi possible de mesurer l'activité biologique d'un extrait, de le normaliser et ainsi de pouvoir comparer les activités des extraits les uns par rapport aux autres.

$$1 : TEQ - bio = \frac{ECx \text{ composé de référence}}{ECx \text{ de l'extrait environnemental}}$$

Où ECx correspond à la concentration pour laquelle x% de l'activité biologique maximale est observée.

**Calcul de la TEQ-chim** : En parallèle, l'analyse chimique permet d'identifier et de quantifier des polluants. Pour chaque polluant, le TEF est déterminé. Ce coefficient correspond au degré d'activité biologique d'un composé par rapport à un composé de référence (Figure 30). Celui-ci est dépendant de l'activité biologique étudiée (ex : activité ER, EROD...). Dans le cas où ce coefficient n'est pas déjà connu, l'activité du composé devra être étudiée et sa courbe dose-réponse déterminée afin de l'obtenir.

$$2 : TEF_i = \frac{ECx \text{ composé de référence}}{ECx \text{ du composé } i}$$

Avec TEF<sub>i</sub> le facteur d'équivalent toxique du composé i et ECx la concentration pour laquelle x % d'activité est mesuré par rapport au maximum d'activité.

Une fois les TEF des composés identifiés obtenus, il est possible de déterminer la TEQ-chim de ces derniers. La TEQ-chim correspond à la somme des TEF des contaminants multipliés par leurs concentrations. Si la TEQ-chim est différente de la TEQ-bio, ceci implique qu'un ou des composés non identifiés sont responsables d'une partie de l'activité observée. Dans ce cas l'investigation doit être approfondie afin d'identifier ces inducteurs.

$$3 : TEQ - chim = \sum_{i=1}^n TEF_i \times C_i$$

### **Limite de l'approche** :

Il s'agit d'un outil utile mais dont l'approche repose sur un modèle additif et coup par coup (Safe, 1998). Comme toute extrapolation, elle se fait sans tenir compte des différences d'interaction des composés avec le récepteur, des effets de mélanges ou de la modification de concentration des composés lors des bioessais (ex : métabolisation des HAP par les cellules PLHC-1). Il est important de garder ces limites à l'esprit lors de l'analyse (Safe, 1998).

### **Origine des TEF** :

Les TEF utilisés lors de ce travail proviennent de la thèse de Nicolas Creusot (2011) pour les composés oestrogéniques et de l'article de Louiz et al. (2008) pour l'activité AhR des HAP.

L'ensemble des autres facteurs d'équivalent toxique des composés identifiés ont été déterminés au LPTC.

## **V. Fractionnement de l'extrait du sol sélectionné par CLHP**

La séparation des contaminants afin de simplifier l'identification des composés biologiquement actifs dans les extraits complexes de la matrice environnementale est une étape nécessaire dans l'identification de composés biologiquement actifs dans les mélanges complexes. L'extraction est déjà considérée en soi comme une étape de séparation des composés chimiques des autres composés de la matrice environnementale pouvant interférer lors des analyses tels que les minéraux, les sels, les protéines, les acides humiques, les lipides, les polysaccharides, etc (Brack et al., 2011). Le fractionnement est basé sur les propriétés intrinsèques des composés de l'extrait impliquant soit des interactions non spécifiques telles que les liaisons de van der Waals ou des liaisons plus spécifiques telles que les liaisons hydrogènes (Brack et al., 2011). Le fractionnement est une étape sensible en EDA qui peut être source de contamination ou de perte de composés, ce qui nécessite l'utilisation d'une démarche qualité afin de s'assurer de l'exactitude de la démarche globale (Bakker et al. 2007 ; voir VIII. La démarche qualité appliquée lors des expériences).

Il existe de nombreuses procédures de fractionnement qui peuvent être plus ou moins complexes. Elles doivent cependant permettre la production de suffisamment d'échantillon pour pouvoir réaliser les analyses chimiques et biologiques des fractions créées. La technique la plus couramment utilisée pour réaliser le fractionnement est la chromatographie et plus spécifiquement la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP ou plus fréquemment connue sous l'abréviation anglais HPLC : high performance liquid chromatography).

La CLHP, comme l'ensemble des chromatographies permet une séparation rapide des composés d'un mélange grâce à la haute pression. Dans le principe, l'échantillon à analyser est poussé par un liquide (appelé phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire de fine granulométrie. En entrant en contact avec la phase stationnaire, des interactions se créent entre les composés et cette phase entraînant une élution plus ou moins rapide des composés en fonction de leurs propriétés physico-chimiques et de leur équilibre de partage entre la phase mobile et stationnaire. En général, la composition de la phase mobile est modifiée au cours de l'analyse où un gradient de solvant est observable. Ce gradient permet modifier les propriétés de la phase mobile et ainsi d'éluer l'ensemble des composés de l'extrait environnemental de la phase stationnaire (modification de la force éluante).

Il existe plusieurs approches en CLHP, cependant deux sont plus associées à l'EDA (Tableau 8 de la synthèse bibliographique) : La phase inverse (RP-CLHP) et la phase normale (NP-CLHP). Ces deux approches font intervenir des phases stationnaires permettant une séparation des composés en fonction de leur polarité. Il est très important d'avoir en tête les caractéristiques du fractionnement car le temps d'élution des composés est intimement lié à leur structure et leur composition (Brack et al., 2011).

Pour ces travaux, le fractionnement et les tests associés ont été réalisés grâce à une chaîne CLHP (Agilent HPLC system, série 1200) équipée d'un détecteur UV/Visible à barrettes de diodes (Agilent série 1200) et d'un collecteur automatique de fractions (Agilent série 1260 infinity) (Agilent Technologies, Les Ulis, France). Ce matériel est présenté Figure 31.

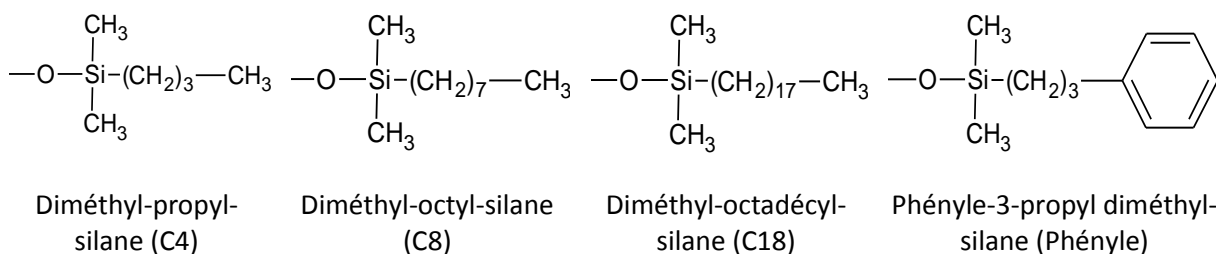


**Figure 31** : Chaîne HPLC équipée d'un détecteur UV/Visible à barrettes de diodes et d'un collecteur automatique de fractions (Agilent Technologies, Les Ulis, France).

Les caractéristiques à connaître de la RP-CLHP et de la NP-CLHP ainsi que les méthodes utilisées pour le fractionnement sont détaillées ci-dessous.

### 1. La méthode en phase inverse (RP-CLHP)

Dans la chromatographie de partage en phase inverse, la phase mobile est polaire et la phase stationnaire apolaire. La phase stationnaire est un gel de silice greffé de molécules organiques apolaires (Figure 32) tandis que la phase mobile est composée de solvants polaires (eau, ACN : acétonitrile, méthanol...). Avec ce type de chromatographie, les composés apolaires sont élués en dernier.



**Figure 32** : Exemple de greffons utilisés en phase inverse

Bien qu'il y ait de nombreuses phases sur le marché, le fractionnement pour l'EDA est principalement réalisé avec des colonnes composées de phase en C18 (Jopet al., 1991 ; Desbrow et al., 1998). C'est pourquoi les tests de développement de méthode ont été réalisés avec ce type de phase inverse.

**Fractionnement en phase inverse (RP-CLHP)** : Pour les tests et le fractionnement, ces travaux sont basés sur ceux de Creusot (2011) et Creusot et al. (2013). L'ensemble des échantillons sont injectés de la même façon. Avant injection 250  $\mu\text{L}$  de l'échantillon sont évaporés et repris dans 100  $\mu\text{L}$  d'un mélange d'eau ultra-pure et d'acétonitrile (80/20, v:v). L'injection se fait sur une colonne de silice greffée avec des chaînes composés de 18 atomes de carbone (C18 Spherisorb ODS2, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 x250 mm) (Waters, Milford, USA) avec un gradient d'une durée de 120 min débutant par un mélange eau ultra-pure/acétonitrile (80/20, v:v) et se terminant à 100 % d'acétonitrile avec un débit fixé à 1 mL.min<sup>-1</sup> (Tableau 28). Toutes les 3 min, une fraction est collectée. Au total, 40 fractions sont obtenues (f1 à f40) et évaporées sous flux d'azote à 45°C avant reprise dans 250  $\mu\text{L}$  d'acétonitrile. Ensuite chaque fraction est

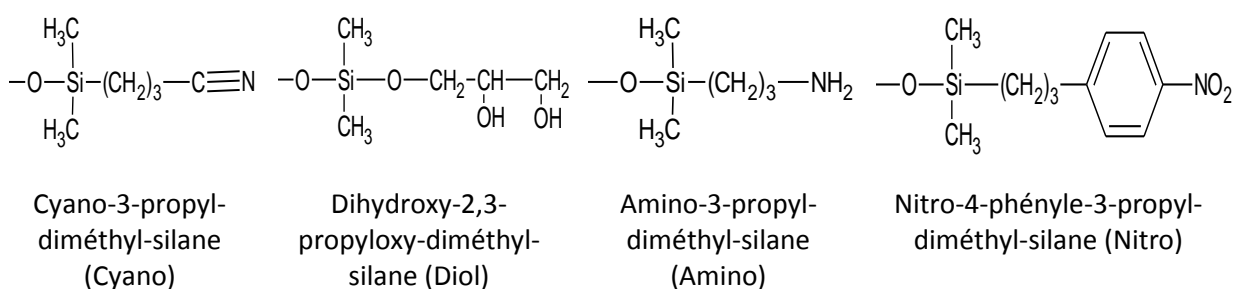
divisée en deux, l'une destinée aux analyses chimiques (100µL) et l'autre aux tests biologiques (150 µL). Sur le volume de 150 µL destiné aux tests biologiques, 50µL de chaque fraction sont récupérés et regroupés en un seul « pool » afin de recréer le mélange original pour le contrôle qualité (voir la partie IX : La démarche qualité appliquée lors des expériences). Tout comme les extraits, les fractions sont suivies par la masse et conservées à -20°C.

**Tableau 28** : Paramètres d'élution utilisés pour le fractionnement en phase inverse

Temps (min)	Débit (mL/min)	%ACN	%H2O
0	1	20	80
10	1	20	80
60	1	45	55
100	1	100	0
120	1	100	0
120,01	1	20	80
125	1	20	80

## 2. La méthode en phase normale

La chromatographie de partage en phase normale est composée d'une phase mobile apolaire et d'une phase stationnaire polaire. Avec ce type de chromatographie, les composés polaires sont élués en dernier. La Figure 33 présente différents types de phases stationnaires qui peuvent être trouvées dans le commerce.



**Figure 33** : Exemple de greffons utilisés en phase normale

Les fractionnements pour les matrices solides à l'approche EDA sont principalement effectués en phase normale (Fetter et al. 2014 ; Regueiro et al. 2013 ; Schmitt et al. 2011 ; Kaisarevic et al. 2009 ; Marvin et al. 2000 ; Marvin et al. 1999 ; Marvin et al. 1994). Les tests de développement de méthode ont donc été réalisés également en phase normale avec une colonne de type NH2 (Figure 33) et selon la méthode de fractionnement utilisée dans la thèse de Gardia-Parege (2015).

**Fractionnement en phase normale** : Le fractionnement en phase normale est réalisé sur 250 µL d'échantillon préalablement évaporés et repris dans 100 µL d'hexane. La séparation des molécules s'effectue sur une colonne de silice greffée avec des amines (Microsorb NH2 100-5, 4,6 x 250 mm, Varian®) (Agilent technologies, Les Ulis, France). Le gradient d'élution est composé de trois solvants : pentane, dichlorométhane et acétonitrile. Les conditions du gradient sont résumées au Tableau 29. Une fraction est collectée toutes les 2 min. Au total, 20 fractions sont obtenues par NP-HPLC (f1 à f20) et sont évaporées sous flux d'argon à 45°C. Chaque fraction est reprise dans 250 µL de dichlorométhane, est divisée en deux pour



effectuer les tests biologiques (150 µL) et en parallèle les analyses chimiques (100 µL). Tout comme le fractionnement en RP-HPLC, sur le volume de 150 µL destiné aux tests biologiques, 50µL de chaque fraction sont récupérés et regroupés afin de recréer le mélange original pour le contrôle qualité (voir la partie IX : La démarche qualité appliquée lors des expériences). Toutes les fractions sont suivies par la masse et conservées à -20°C.

**Tableau 29** : Paramètres d'élution utilisé pour le fractionnement en phase normale.

Temps (min)	Débit (ml/min)	Pentane (%)	Dichlorométhane (%)	Acétonitrile (%)
0	1	100	0	0
7	1	100	0	0
17	1	0	100	0
22	1	0	100	0
26	1	0	0	100
30	1	0	0	100
35	1	0	100	0
40	1	100	0	0
45	1	100	0	0

### 3. Sélection du type de fractionnement en HPLC à appliquer sur les sols étudiés

Afin de sélectionner le type de fractionnement à appliquer sur les échantillons de cette étude, une solution de composition connue et respectant le modèle additif a été testée pour ses activités ER et AhR à différentes étapes du fractionnement. Des blancs subissant les mêmes étapes ont également été réalisés afin de vérifier qu'aucune étape du fractionnement n'est responsable de contaminations involontaires.

Les blancs qui ont été réalisés sont les suivants :

- Les blancs solvants d'injection en CLHP. Il s'agit de 100 µL d'un mélange d'eau et d'acétonitrile (80 :20) pour l'injection en phase inverse (RP-HPLC) et de 100 µL d'isooctane ou d'hexane pour l'injection en phase normale (NP-HPLC) : ces blancs permettent de vérifier la non-contamination des solvants d'injection.
- Les blancs d'élution en RP-HPLC et NP-HPLC : Ici, le gradient d'élution est reconstitué sans passer dans le système HPLC. Ils permettent de vérifier que l'étape de concentration sous flux d'azote post fractionnement n'est pas une source de contamination.
- Les blancs RP-HPLC et NP-HPLC : Ces blancs subissent l'ensemble des traitements que subissent les échantillons. Ils permettent en les comparant aux blancs d'élution et aux blancs solvants d'injection de vérifier que le système de fractionnement en HPLC n'est pas une source de contamination des échantillons.
- Le blanc DMSO (Diméthyl sulfoxyde) : Il s'agit du solvant utilisé lors des biotests, sa contamination possible doit également être testée.

Pour la mesure de l'activité biologique un mélange de composé répondant aux bioessais AhR et ER a été réalisé. Il s'agit d'un témoin positif (Tableau 30):

**Tableau 30** : Composés présents dans la solution testée pour la répétabilité, classés selon leur activité biologique.

Activité	Nom	Concentration en µg/mL acétone
ER	Oestrone	0,0027
	Oestradiol	0,0008
	Bisphénol A	18,33
	4t-octylphénol	8,23
	o,p-Dichlorodiphényltrichloroéthane	34,57
AhR	3,3',4,4',5-Pentachlorobiphényle	0,155
	2,3,7,8-Tétrachlorodibenzo-p-dioxine	0,0179
	Dibenzo[ah]anthracene	0,0819
	Benzo[k]fluoranthène	0,0721

Les témoins positifs ont été réalisés sous n=6 pour le témoin positif simple, en triplicat pour les autres conditions et pour les deux types de chromatographie :

- Témoin positif simple : le mélange est directement dilué dans du DMSO. Ceci permet de vérifier que les réponses obtenues par les bioessais sont peu variables
- Témoins positifs avec reconstitution du gradient (NP-HPLC et RP-HPLC) : Ceci sert à vérifier que la concentration sous flux d'azote n'est pas une source de perte de composés et par conséquent d'activité biologique de la solution.
- Témoin positif passé en NP-HPLC et en RP-HPLC : Ceci permet de vérifier que le système de fractionnement en HPLC est intègre et n'entraîne pas des pertes de composés et d'activité.

L'ensemble de ces échantillons ont été testés pour leur activité biologique et comparés statistiquement. Le témoin positif simple a été comparé à l'activité biologique théorique par le biais d'un test t de student. Quant aux autres témoins, leur activité a été comparée au témoin positif simple grâce au test non paramétrique de Mann-Whitney. Les résultats sont présentés dans la partie résultats (II.1. Comparaison entre un fractionnement en phase normal et en phase inverse)

## VI. Analyse chimiques des fractions positives pour l'identification des composés biologiquement actifs

Une fois le fractionnement réalisé et les fractions positives aux bioessais déterminées. Ces dernières sont analysées par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse afin d'identifier les composés présents. Les approches employées pour l'analyse des fractions sont présentées ci-dessous après quelques rappels sur la chromatographie et la spectrométrie de masse.

### 1. Généralités sur la chromatographie et la spectrométrie de masse

#### 1.1. La chromatographie

La chromatographie est un système de séparation des composés chimiques d'un échantillon qui repose sur leurs propriétés physico-chimiques. Il est possible de classer les techniques chromatographiques selon différents critères. L'un d'eux est la nature de la phase mobile qui

permet de distinguer la chromatographie en phase gazeuse (CG ou GC en anglais) et en phase liquide (CL ou LC en anglais).

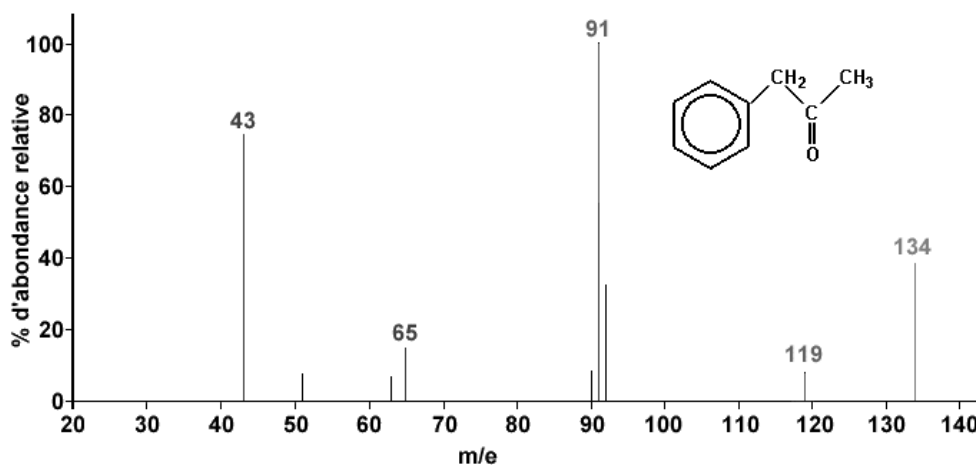
Afin d'analyser les fractions, un choix a du être effectué entre ces deux méthodes chromatographiques. Le choix s'est porté principalement sur la CG qui est préférentiellement employée pour les composés apolaires, volatils et thermiquement stables tels que les HAP et les PCB. Ce choix a été motivé par le type de molécules qui sont retrouvées au niveau des sols industriels et dont l'analyse est réalisée avec ce type de chromatographie. L'ensemble des fractions ayant répondu aux bioessais ont été analysées par CG. La CL est utilisée pour la séparation des composés polaires, son utilisation a été moins importante pour ce travail cependant les fractions les plus polaires ont également été analysés par cette méthode de séparation.

Travaillant en inconnu, il est nécessaire d'avoir une bonne résolution chromatographie qui correspond à la capacité d'une colonne à discriminer les composés les uns des autres. Afin d'augmenter cette résolution des gradients longs ont été mis en place. En CG, ce gradient dépend de l'augmentation de la température du four ; plus la température augmente lentement, plus la résolution augmente. Pour la LC, plus le gradient de solvant est long, plus la résolution augmente. La contrepartie de l'augmentation de la résolution est une augmentation du temps d'acquisition.

La chromatographie permet de séparer les composés mais pas de les détecter. Pour cela elle est couplée à un détecteur qui va pouvoir les identifier. Parmi les différents types de détecteurs, il existe la spectrométrie de masse qui est régulièrement utilisée en EDA (Leonards et al. 2011).

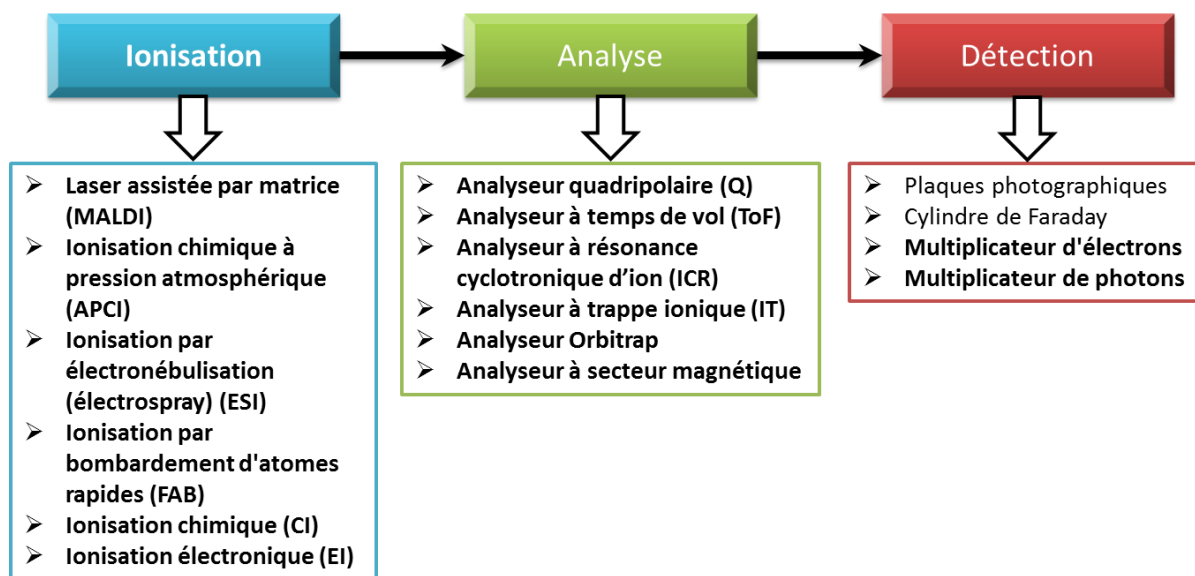
## 1.2. La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse permet de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse et ainsi de caractériser leur structure chimique. Dans le principe, les molécules sont ionisées et fragmentées. Suite à cela, les ions ainsi formés sont séparés selon leur rapport masse (m) sur charge (z) avant d'arriver à un détecteur qui compte et amplifie le signal émis par les ions. Ce signal est alors traité informatiquement afin d'obtenir un spectre de masse des ions détectés où le rapport m/z correspond aux abscisses et l'abondance relative de ces ions aux ordonnées. Le spectre de masse est plus ou moins spécifique d'une molécule donnée. La Figure 34 représente le spectre de masse d'une molécule comme exemple.



**Figure 34** : Spectre de masse de la 1-phényl-2-propanone de masse molaire = 134,18 g/mol.

Il existe différentes méthodes pour l'obtention d'un spectre de masse qui sont représentées Figure 35.



**Figure 35** : Présentation des différentes méthodes utilisables en spectrométrie de masse

La sensibilité, la résolution et les gammes de masses suivies en spectrométrie de masse dépendent du type d'analyseur. Les différences entre les analyseurs sont très bien expliquées dans l'article de Holcapek et al. 2012. Pour effectuer de l'identification de composés, il est nécessaire d'avoir une exactitude sur la masse des ions formés la plus élevée possible afin de ne pas se tromper. Les détecteurs à temps de vol ont une exactitude sur la masse comprise entre 0,1 et 0,0006 ( $\Delta m/z$ ) contrairement aux quadripôles où elle est de 1 à 0,6 ( $\Delta m/z$ ). Ceci indique que l'analyseur à temps de vol est de 6 à 1600 fois plus précis sur la masse d'un composé qu'un quadripôle. Ces détecteurs étant les seuls présents au laboratoire, c'est pourquoi le temps de vol a été choisi pour cette étude. Il existe d'autres détecteurs encore plus résolutifs sur la masse tels que l'orbitrap ou l'analyseur à résonance cyclotronique (FT-ICR) qui peuvent également présenter un grand intérêt dans l'identification de composés inconnus.

La spectrométrie de masse peut également être réalisée en tandem (LC-MS/MS ; GC-MS/MS). Ceci consiste à identifier un ion grâce à un premier analyseur, à le fragmenter (grâce à un quadripôle par exemple) puis à détecter par un deuxième analyseur les fragments générés. Ceci implique d'avoir au minimum 2 analyseurs en série. C'est ce qu'on appelle une MS/MS dans l'espace. Il est aussi possible d'avoir un seul analyseur et d'alterner entre une analyse en spectrométrie simple (MS) des ions d'intérêt et une fragmentation de l'ion avant analyse des fragments. Cela s'appelle alors de la MS/MS dans le temps. La spectrométrie en tandem permet d'aider à l'élucidation des composés détectés grâce aux fragments créés.

Les analyses des fractions actives ont été effectuées par chromatographie gazeuse couplée à un ToF simple pour la chromatographie gazeuse. En effet, l'utilisation de l'impact électronique comme moyen d'ionisation permet de fragmenter dans la source les ions formés et d'aider ainsi à l'identification des composés présents. Pour les analyses en LC-Q/ToF, elles ont été réalisées en tandem avec comme détecteur le temps de vol et comme moyen de fragmenter,

l'utilisation d'un quadripôle (Il s'agit ici de MS/MS dans le temps). Voici les caractéristiques des analyses et le mode de traitement des chromatogrammes obtenus.

## 2. Les analyses par GC-(Q)/ToF

Les analyses sont réalisées par chromatographie en phase gazeuse (GC, série 7890 B, Agilent technologies, Santa Clara, USA) couplée à un spectromètre de masse hybride Q-ToF (série 7200, Agilent technologies, Santa Clara, USA) (Figure 36).



**Figure 36** : GC-Q/ToF (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

L'acquisition des données est effectuée en *mode balayage* et seulement en employant le ToF (*i.e.* mode MS). Une source à impact électronique est utilisée pour former les ions radicalaires. Ces derniers, pouvant être instables, peuvent se fragmenter dans la source. Grâce à cette interface, l'utilisation du mode MS permet d'obtenir la masse exacte des ions mais également des informations sur la fragmentation de la molécule. Les conditions analytiques sont présentées Tableau 31.

**Tableau 31** : Paramètres pour l'analyse des fractions par GC-ToF

Eléments	Paramètres
Colonne	HP-5MS (Agilent technologies, Massy, France) 5 % Phényle- 95 % Méthyle-siloxane (30 m x 250 $\mu$ m x 0,25 $\mu$ m)
Source / énergie	Impact électronique / 70 ev (avec azote)
Mode d'injection/Température/débit de purge	Sans division pulsé / 280°C /60 mL.min <sup>-1</sup> pendant 1,5 min
Volume d'injection	1 $\mu$ L (Dichlorométhane)
Gaz vecteur	Hélium (99.9990%)
Débit	1,3 mL.min <sup>-1</sup>
Gradient de température	50°C pendant 2 min, 2°C.min <sup>-1</sup> jusqu'à 325°C maintenu durant 0,5 min
Temps d'acquisition	145 min
Paramètres de scan	Masse minimale : 50 m/z ; Masse maximale : 550 m/z
Fréquence d'acquisition	2GHz
Taux d'acquisition	5 spectres/seconde
Temps d'acquisition	200 ms/spectre

Les données chromatographiques sont traitées avec le logiciel *MassHunter Qualitative* (Agilent Technologies). Le traitement est uniquement effectué manuellement. Les pics du chromatogramme (TIC : total ion chromatogramme) sont analysés individuellement si la hauteur du pic est 10 fois supérieure au bruit de fond. Après obtention du spectre de masse d'un pic, le bruit de fond est retiré en utilisant le spectre de masse de la ligne de base du TIC. Puis le spectre résultant est comparé à la base de données spectrale NIST11. Si une molécule est identifiée une recherche sur les bases de données PubChem et Chempider est réalisée afin d'obtenir ses caractéristiques et vérifier si elle est reconnue pour avoir une activité biologique vis-à-vis du bioessai ayant répondu.

Les molécules identifiées et candidates pour l'analyse biologique étudiée sont alors achetées si elles sont disponibles sur le marché afin de confirmer leur identité et leur activité.

### 3. Les analyses par LC-Q/ToF

Les analyses sont réalisées avec une chaîne HPLC (série 1209 Infinity, Agilent technologies, Santa Clara, USA) couplée à un spectromètre de masse hybride QTOF (série 6540, Agilent technologies, Santa Clara, USA) (Figure 37).



**Figure 37** : LC-QTOF (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

Les composés sont séparés sur une colonne de silice greffée avec une chaîne alkyle de 18 atomes de carbone (Kinetex® C18, 100 x 2,1 mm, 1,7  $\mu$ m) (Phenomenex, Agilent technologies, Les Ulis, France). Les solvants d'élution employés sont l'eau ultra-pure MilliQ filtrée sur EDS-PAK et l'acétonitrile. En mode d'ionisation positif, afin d'améliorer la séparation chromatographique, la reproductibilité des analyses et surtout l'ionisation des molécules, de l'acide formique est ajouté dans chaque solvant au volume de 0,1%. L'ensemble des fractions ont été injectées selon les paramètres indiqués Tableau 32.

**Tableau 32** : Paramètres chromatographiques pour l'analyse par LC-Q/ToF

Éléments	Paramètres	
<b>Volume d'injection</b>	2 $\mu$ L	
<b>Phase éluante</b>	A : Eau ultra-pure ( $\pm$ 0,1% acide formique) B : Acétonitrile ( $\pm$ 0,1% acide formique)	
<b>Débit</b>	0,3 mL.min-1	
<b>Gradient</b>	Temps (min)	% B
	0	10
	45	100
	47	100
	49	10
	53	10
<b>Temps d'acquisition</b>	53 min	

Les molécules sont ionisées par électro-nébulisation couplée à un système de gaz gainant (Agilent Jet Stream ESI) permettant une focalisation du flux d'ions et augmentant ainsi la sensibilité analytique. Les paramètres de source ont été déterminés à partir d'une méthode analytique optimisée pour l'analyse multi-résidus (*n.b.* pesticides, hormones et composés pharmaceutiques) (Wund, 2013). Les paramètres sont présentés dans le Tableau 33.

**Tableau 33** : Paramètres de la source d'ionisation des molécules en LC-Q/ToF

Éléments	Paramètres en mode d'ionisation positif	Paramètres en mode d'ionisation négatif
<b>Température du gaz de désolvatation</b>	300°C	300°C
<b>Débit du gaz de désolvatation</b>	8 L.min-1	8 L.min-1
<b>Pression de nébulisation</b>	40 psi	40 psi
<b>Température du gaz fourreau</b>	400°C	400°C
<b>Débit du gaz fourreau</b>	11 L.min-1	11 L.min-1
<b>Tension du capillaire</b>	3000 V	3000 V
<b>Tension du « Nozzle »</b>	0	1500V

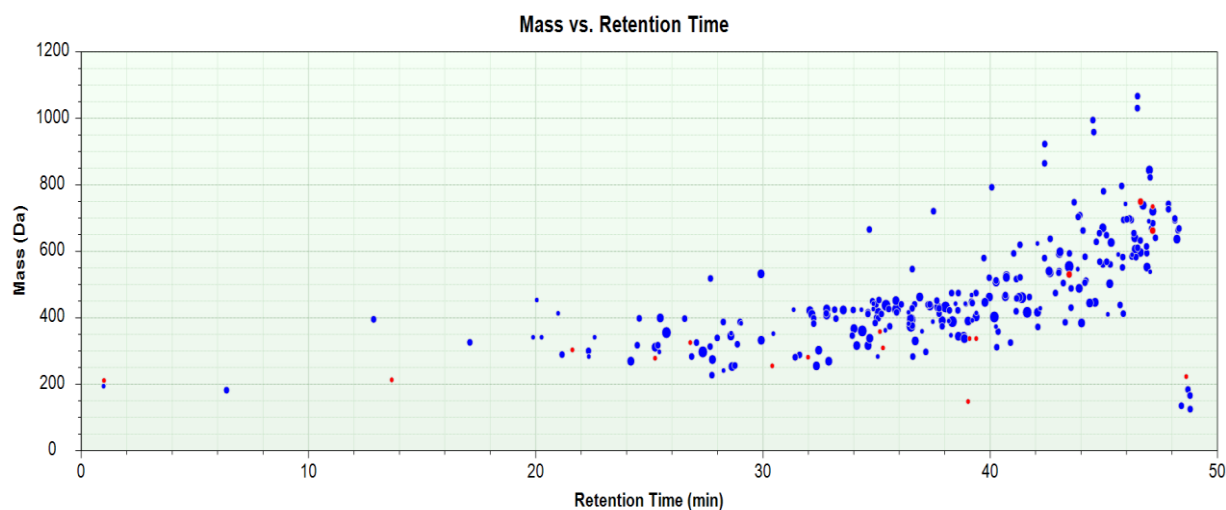
La détection des molécules est réalisée en mode donnés-dépendant. Durant une même acquisition, les composés sont détectés par le ToF (mode MS simple) permettant de connaître avec exactitude (*n.b.* 4-10 Da) le rapport masse sur charge des ions générés ; les plus intenses sont sélectionnés puis fragmentés et analysés en mode MS/MS (Q/ToF) permettant d'obtenir ainsi le spectre de fragmentation des ions sélectionnés. Cette méthode d'acquisition permet en une injection d'obtenir un maximum d'informations sur les composés présents dans l'échantillon.

Les spectres sont acquis sur une gamme de masse comprise entre 70  $m/z$  et 1700  $m/z$  à une fréquence d'acquisition de 2 GHz. Les ions précurseurs sont soumis à trois énergies de collision (*e.g.* 10, 20 et 40 V ou 20, 40 et 60 V) lors de la fragmentation.

Durant l'acquisition, un composé de référence est continuellement injecté (HP-921 = hexakis(1H, 1H, 3H-tétrafluoropropoxy)phosphazine ; 922.009798  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>, 966.000725

$m/z$  [M+HCO<sub>2</sub>]) afin de s'assurer qu'aucune dérive en masse n'est apparue au cours de l'enregistrement des données.

Les données chromatographiques sont traitées avec le logiciel *MassHunter Qualitative* (Agilent technologies). À l'issue de l'analyse en mode MS/MS, les ions présents dans l'échantillon sont recherchés automatiquement par une fonction du logiciel (Feature by Molecular Extraction, MFE) permettant d'extraire les ions par leurs caractéristiques moléculaires (i.e. temps de rétention, intensité...) via un algorithme. Tous les ions qui possèdent une intensité supérieure à 10 fois le bruit de fond sont recherchés. L'état de charge maximum, la formation de molécules protonées ou déprotonées et la présence possible d'adduits sont renseignés préalablement avant le lancement de l'algorithme. Les ions [M+H]<sup>+</sup>, [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, [M+Na]<sup>+</sup> et [M+K]<sup>+</sup> sont rentrés dans les paramètres d'attribution lors des analyses en mode d'ionisation positif et [M-H]<sup>-</sup>, [M+Cl]<sup>-</sup> et [M+HCOO]<sup>-</sup> pour le mode négatif. Les masses mono-isotopiques des ions détectés sont établies automatiquement. La formule brute des composés détectés est ensuite établie automatiquement en se basant sur la masse mono-isotopique mesurée et l'amas isotopique obtenu au cours de l'acquisition. La formule est déterminée en utilisant les atomes C, H, N, O, S, F, P, Cl et Br. Seule les formules possédant un score supérieur à 50 % sont générées. Ce score comprend l'adéquation entre masse mesurée et masse théorique obtenue par les atomes constitutifs, l'abondance et l'espacement de chaque pic du profil isotopique. La même démarche est effectuée sur les échantillons et les blancs protocoles associés. Les listes générées de molécules détectées dans les échantillons et dans les blancs sont ensuite comparées via le logiciel MassProfiler (Agilent technologies, France). Un exemple de comparaison des données obtenues est montré Figure 38.



**Figure 38** : Illustration d'un graphique obtenu par MassProfiler. En bleu, les composés détectés dans l'échantillon et en rouge dans le blanc associé.

L'utilisation du logiciel MassProfiler permet de visualiser rapidement les molécules présentes dans tel ou tel échantillon et/ou présentes dans le blanc de protocole. Ainsi, cette étape permet de distinguer les composés présents uniquement dans un échantillon de manière à réduire la liste des molécules détectées en se focalisant seulement sur les composés d'intérêt (i.e. non détectés dans le blanc, seulement présents dans l'échantillon sélectionné).



Les spectres de fragmentation des ions d'intérêt permettent de donner des informations sur la structure de la molécule et sur son identité potentielle. Tout d'abord, les spectres de fragmentation pour les composés à identifier sont comparés aux spectres de fragmentation disponibles dans les banques de données spectrales. Plusieurs librairies pouvant être privées ou en libre-service peuvent être interrogées. Trois bases de données disposant de spectres de fragmentation ont été employées durant ces travaux :

- **Metlin** : banque de données en libre-service pour LC-Q/ToF possédant 62 020 références (Smith et al., 2005, <http://metlin.scripps.edu/index.php>).
- **Forensic** : banque de données privée pour LC-Q/ToF possédant 7 360 composés.
- **Massbank** : banque de données en libre-service et pouvant être continuellement alimentée par les laboratoires d'analyse disposant de 30 521 références (tout type d'instrument analytique confondu) (Horai et al., 2010, <http://www.massbank.jp/>, <http://massbank.ufz.de/MassBank/>).

Lorsque les spectres correspondent, le nom du composé est retenu comme candidat et ses caractéristiques recherchées sur les bases de données PubChem et ChempSpider. Si aucune correspondance n'est obtenue, la formule brute du composé est entrée dans la base de données Pubchem afin de savoir si elle est associée à une structure précise.

Les molécules identifiées et candidates pour l'analyse biologique étudiée sont alors achetées afin de confirmer leur identité et leur activité.

## **VII. Les approches pour confirmer des molécules identifiées potentiellement actives**

Une fois les composés candidats identifiés pour expliquer l'activité biologique observée, il est important de confirmer que ces molécules sont bien à l'origine de ces effets. Cette confirmation est réalisée si et seulement si les standards de ces molécules sont disponibles dans le commerce. Il s'agit d'une des étapes limitantes de l'EDA car les molécules identifiées peuvent être des produits de dégradation non commercialisés ou des molécules inédites, peu utilisées à l'heure actuelle par les laboratoires ou l'industrie. Elles sont donc soit indisponibles sur le marché soit vendues à des prix élevés. Quatre étapes sont réalisées afin de confirmer que les molécules identifiées sont celles qui sont actives :

- La première étape consiste à tester biologiquement la molécule incriminée pour l'activité biologique détectée. Si la molécule est inactive, la confirmation s'arrête à ce niveau. Par contre, si la molécule entraîne une réponse biologique, son facteur d'équivalent toxique est alors déterminé et la confirmation continue avec des analyses chimiques.
- La seconde étape consiste à analyser la molécule par CLHP afin de vérifier que son temps d'élution correspond au temps de collecte de sa fraction. Si ce n'est pas le cas, l'identification n'a pas été correcte. Il est important de noter que certaines molécules peuvent se trouver dans plusieurs fractions (2 en général) si leur temps d'élution correspond à un changement de fraction.
- La troisième consiste à vérifier analytiquement que la molécule identifiée lors des analyses chimique est la bonne en comparant son temps de rétention avec la molécule identifiée lors du criblage ainsi que son spectre de masse.
- La dernière étape consiste à doser les molécules identifiées afin de quantifier leur part de responsabilité dans l'activité biologique observée. Dans cette étude, ce travail s'est

accompagné d'une étape de développement de dosage des molécules par GC-MS et du dosage de ces molécules dans les fractions où elles ont été identifiées.

## **VIII. La démarche qualité appliquée lors des expériences**

Afin de s'assurer de la pertinence et de l'exactitude des résultats obtenus lors des analyses, une démarche qualité a été mise en place. Ceci inclut des contrôles aussi bien au niveau de l'analyse globale qu'au niveau des différentes analyses qu'elles soient chimiques ou biologiques.

### **1. Le processus qualité au cours de l'approche EDA**

L'analyse dirigée par les effets est réalisée pour chaque échantillon en triplicat de l'extraction à l'analyse biologique afin de vérifier la robustesse de la méthode et l'exactitude des résultats. De plus, un blanc protocole est traité en parallèle de l'échantillon afin d'identifier tout type de contaminations involontaires. Les fractions du blanc protocole sont également injectées avant les fractions correspondantes de l'échantillon lors des analyses par GC-Q/ToF et LC-Q/ToF afin d'être dans les mêmes conditions chromatographiques et ainsi ne pas prendre en compte lors de l'analyse, les composés qui se trouvent à la fois dans la fraction du blanc protocole et de l'échantillon.

### **2. Les biotests et leurs témoins**

Lors des bioessais, en plus des témoins négatifs (solvant et cellulaire) et des témoins positifs réalisés sur l'ensemble des plaques, les cellules sont, lors d'une série de lecture exposées aux gammes des témoins positifs pour une activité biologique donnée qui servent également de molécules de référence. Ceci permet non seulement d'obtenir l'EC20 de ces molécules pour déterminer les TEQ-bio des extraits et les TEF des composés analysés mais aussi de réaliser un suivi des EC20 afin de vérifier que la réponse biologique des cellules reste stable.

### **3. Suivi qualité des analyses chimiques**

#### **3.1. Pour les injections en HPLC en vue d'un fractionnement**

Pour s'assurer de la répétabilité de la procédure de séparation (*ex*: temps de rétention), une solution de contrôle qualité contenant 9 et 16 composés en phase inverse et phase normale, respectivement, est injectée avant chaque fractionnement. De façon à vérifier l'absence de contamination, un blanc de procédure est réalisé en amont du fractionnement du blanc protocole et de l'extrait de l'échantillon.

#### **3.2. Pour les analyses chimiques**

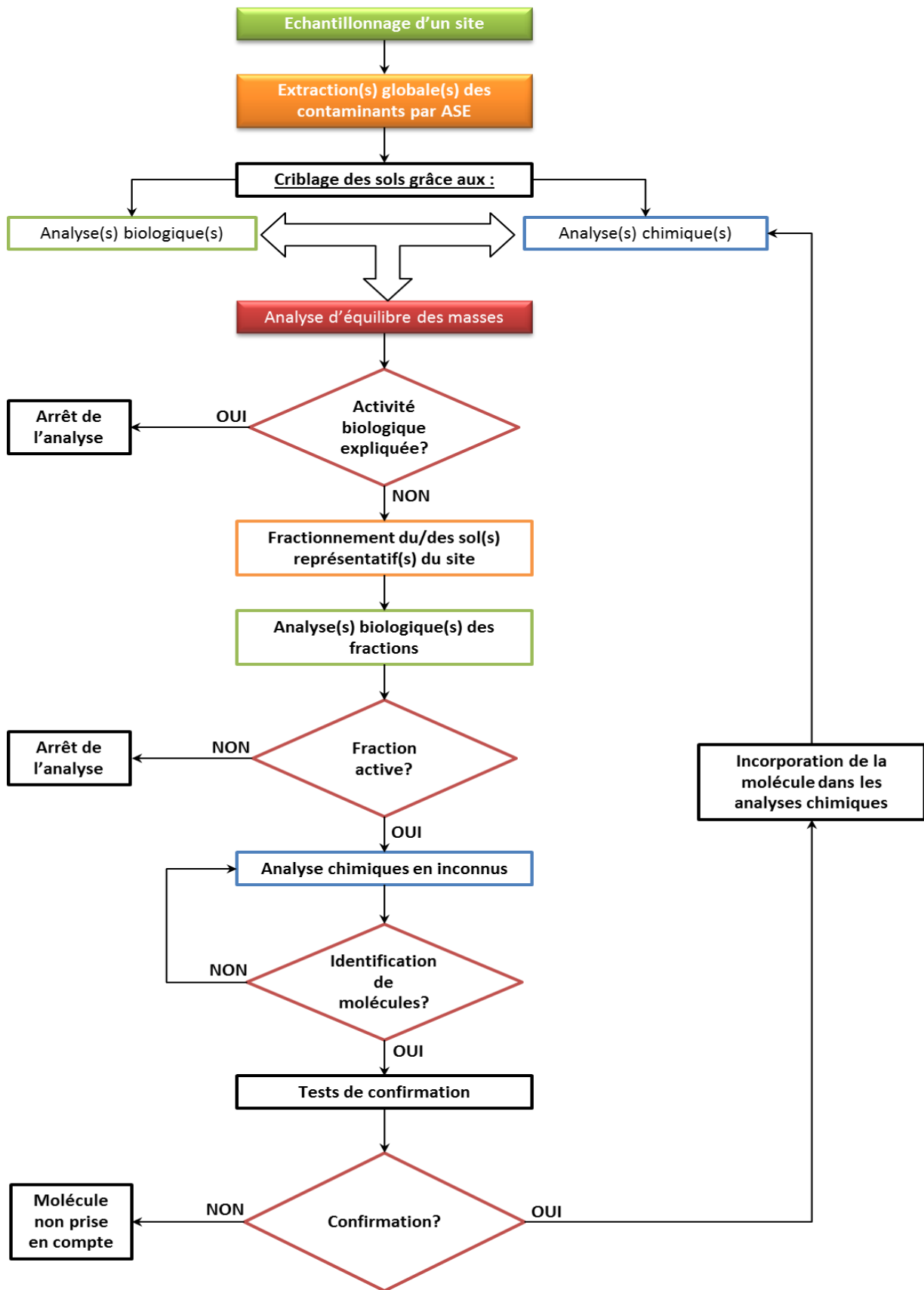
En ce qui concerne les analyses ciblées : Pour l'ensemble des purifications, un blanc protocole est réalisé en même temps que le traitement des échantillons. Lors des injections en chromatographie, des étalons internes de rendement sont ajoutés à l'extrait afin de s'assurer de l'exactitude de l'analyse et du bon rendement lors de la purification. Plus ce rendement est proche de 100%, plus les résultats de l'analyse sont corrects.

Pour les analyses non ciblées : La résolution et la calibration des spectromètres de masse sont vérifiées par l'infusion d'une solution de calibration spécifique à chaque appareil fournie par le fabriquant.

Pour l'ensemble des analyses : Chaque instrument analytique est vérifié avant chaque utilisation et plusieurs éléments sont contrôlés avant et pendant l'acquisition des données. Les limites de détection et de quantification des composés recherchés et la répétabilité des analyses font l'objet d'un suivi régulier. Pour éviter toute contamination croisée, des blancs solvants sont injectés entre chaque injection d'échantillons tout au long de la séquence d'acquisition. Pour contrôler l'absence d'une dérive instrumentale, une solution standard, contenant les composés à doser et leur étalon interne pour les analyses chimiques ciblées ou des molécules connues pour les analyses chimiques non ciblées, est injectée régulièrement durant la séquence. Cette solution permet pour les analyses ciblées de déterminer les coefficients de réponses ( $K_i$ ) des différents analytes.

## **IX. Résumé de l'approche**

La Figure 39 présente la procédure d'analyse d'un site. Comme l'indique cette Figure la démarche est auto-apprenante, c'est-à-dire, que l'identification de nouvelles molécules permet leur incorporation dans les analyses chimiques et ainsi leur utilisation lors de la prochaine démarche EDA appliquée à un autre site. L'enrichissement de l'outil devrait permettre *in fine* la prise en compte de l'ensemble des molécules à activité biologique au niveau des sites d'étude et une amélioration significative du diagnostic de la contamination chimique des sols industriels.



**Figure 39** : Procédure lors de l'analyse d'un site avec les prises de décisions à chaque étape.

### **III. Résultats**

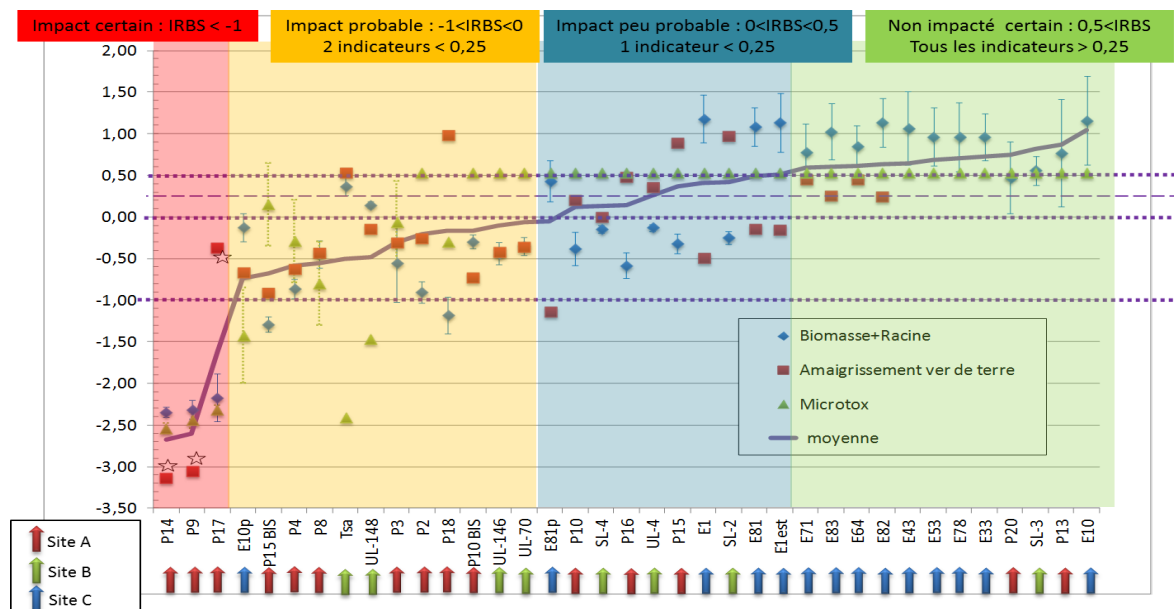
## **I. Développements méthodologiques**

## I. Résultats des différents bioessais appliqués au site d'étude contaminé par la créosote

Le premier site atelier contaminé par de la créosote (site A) et dont les sols sont riches en HAP a été utilisé afin de tester la réponse aux différents bioessais et leur compatibilité avec l'approche EDA. Pour cela, 4 sols ont été utilisés : le P13, le P16, le P8 et le P9. Le choix de ces sols pour ces essais a été motivé par leur localisation au niveau du site (P13 : Témoin non contaminé situé à l'extérieur du site ; P16 : zone de stockage du bois non traité supposé peu contaminé ; P8 : situé à côté des voies de traitement, supposé peu contaminés ; P9 : situé dans la zone d'épandage entre les rails supposé très contaminé) et par les travaux de caractérisation basés sur une démarche d'empreinte « écotoxicologique » par la fondation innovasol. Les travaux d'innovasol ont été réalisés au préalable et avaient pour but d'identifier les zones de contamination au sein du site. Ces bioessais ont été réalisés sur :

- La biomasse aérienne fraîche, la longueur de racines et la longueur de tiges de six espèces végétales (Blé, Sorgho, Cresson, Moutarde, Tomate et Laitue) mises en présence des sols,
- La mortalité et la perte de biomasse du ver de fumier *Eisenia fetida*,
- La diminution de luminescence de la bactérie *Vibrio Fischeri* (Microtox®)

Les sols ont ensuite été hiérarchisés les uns par rapport aux autres grâce à un système de scores qu'est l'indice de réponse biologique du sol (IRBS), un indice utilisé par Jean-François Lascourreges. Avec ce système de scores, les bioessais sont considérés comme très répondants si l'indice est inférieur à -1, de réponse moyenne si le score est compris entre 0 et -1 ; de réponse faible si le score est compris entre 0 et 0,5 et comme non répondants si le score est supérieur à 0,5. L'IRBS moyen calculé sur les résultats des trois bioessais a aussi été



**Figure 40** : Hiérarchisation des sols du site de créosotage (site A), de l'usine à gaz (site B) et d'un troisième site non étudié dans cette thèse (site C) selon les résultats de trois bioessais et l'indice de réponse biologique du sol (IRBS) déterminé.

Les sols ont ensuite été classés selon 4 niveaux d'impacts potentiels :

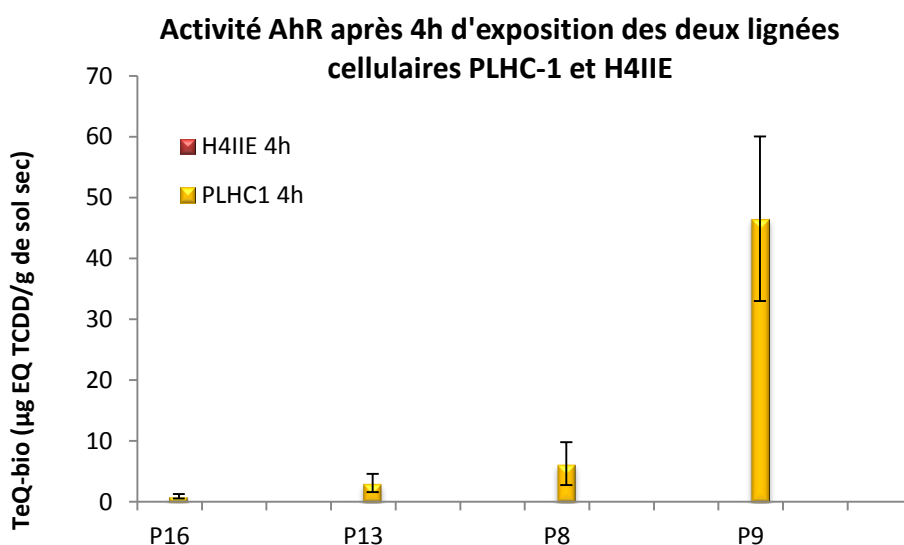
- Impact certain lorsque l'IRBS moyen calculé sur les trois bioessais est inférieur -1.
- Impact probable lorsque l'IRBS moyen est compris entre -1 et 0 et deux des trois bioessais ont un IRBS inférieur à 0,25
- Impact peu probable si l'IRBS moyen est compris entre 0 et 0,5 et l'un des trois bioessais a un IRBS inférieur à 0,25
- Non impacté lorsque l'IRBS moyen est supérieur à 0,5 et si tous les bioessais ont un IRBS supérieur à 0,25.

Les résultats sont présentés Figure 40. Comme indiqué sur cette Figure les quatre sols utilisés pour les tests sur les bioessais dans le but de réaliser l'analyse dirigée par les effets font parti des 4 niveaux d'impacts (P9 : impact certain ; P8 : impact probable ; P16 : impact peu probable et P13 : non impacté certain). Ces quatre sols ont été utilisés pour les tests de développement de la démarche EDA afin de choisir les bioessais répondants.

### 1. Choix de la lignée pour l'activité AhR

#### 1.1. Résultats

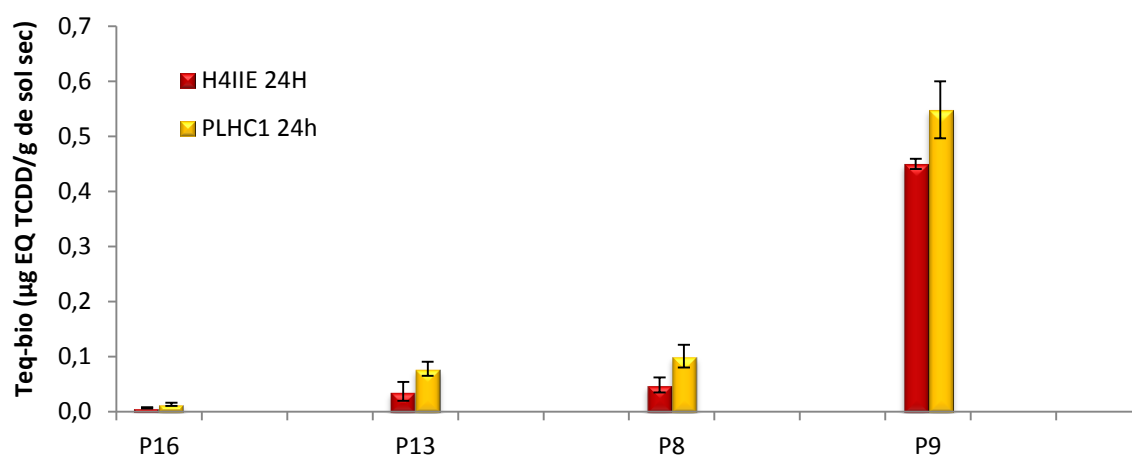
L'activité AhR a été mesurée sur les 4 sols sélectionnés pour l'étude sur les deux lignées (PLHC-1 et H4IIE) présélectionnées comme indiqué dans la partie matériel et méthode (3.2.1.1.1.b). Les résultats sont présentés Figures 41a et 41b. Comme montré Figure 45a, seule la lignée de poisson PLHC-1 répond après 4h d'exposition avec une activité moyenne de 46,4 µg-EQ-TCDD/g de sol pour le P9 et des activités inférieures à 10 µg-EQ-TCDD/g de sol pour les trois autres sols P8, P13 et P16.



**Figure 41a :** Activités AhR obtenues pour les 4 sols étudiés. Les lectures ont été réalisées à 4h pour les lignées PLHC-1 et H4IIE. Elles ont été obtenues en utilisant les EC20 des extraits et la TCDD comme molécule de référence. n=3 pour chaque sol.



### Activité AhR après 24h d'exposition des deux lignées cellulaires PLHC-1 et H4IIE



**Figure 41b** : Activités AhR obtenues pour les 4 sols étudiés. Les lectures ont été réalisées après 24h d'exposition pour les lignées PLHC-1 et H4IIE. Elles ont été obtenues en utilisant les EC20 des extraits et la TCDD comme molécule de référence. n=3 pour chaque sol.

En ce qui concerne la lecture à 24h (Figure 41b), l'activité est observable pour l'ensemble des deux lignées avec des réponses 100 fois moins importantes par rapport à l'activité mesurée après 4h d'exposition (Figure 41a). Comparativement parlant, la hiérarchie de réponse des sols reste la même pour les deux temps de lecture avec une activité moyenne de 0,5 µg-EQ-TCDD/g de sol pour le sol P9 et des activités inférieures à 0,1 µg-EQ-TCDD/g de sol pour les trois autres sols P8, P13 et P16.

#### 1.2. Discussion sur les résultats des tests des lignées cellulaires

Les études bibliographiques ont montré que les lignées cellulaires PLHC-1 et H4IIE avaient la même sensibilité (Whyte et al. 2001 ; Hahn 2002 ; Whyte et al. 2004). Il est vrai que pour une exposition de 24h, la réponse biologique est très proche pour ces deux lignées cellulaires avec des TEQ-bio similaires. Il en est de même pour les EC20 de la molécule de référence (2,3,7,8-Tetrachlorodioxine) qui, après 24h d'exposition sont identiques pour les deux lignées. Cependant, pour des durées d'exposition plus courtes telles que 4h ou 6h (résultats non présentés), aucune activité AhR n'est observable pour la lignée H4IIE. Ceci est en accord avec les résultats de Till et al (1999) qui ont montré que la réponse EROD induite chez des hépatocytes de rats mis en culture (cultures primaires) par le benzo(a)pyrène n'était observable qu'après une exposition de plus de 8h avec un pic d'activité à 40h. Or une diminution de l'activité AhR est observable chez la lignée PLHC-1 entre les lectures de 4h et 24h du fait de la métabolisation de certains composés tels les HAP inducteurs de cette réponse biologique (Louiz et al., 2008; Kinani et al., 2010; Creusot et al., 2013). Il en découle que l'utilisation de la lignée H4IIE peut-être à l'origine d'une perte d'informations du fait de la métabolisation des molécules présentes dans les extraits avant leur induction de la réponse EROD.

L'activité AhR a été mesurée sur trois extraits indépendants issus du même prélèvement de sol et ce, pour l'ensemble des 4 sols. Les résultats montrent une variation faible de la réponse biologique où la moyenne des écart types est de 4,7 µg-Eq TCDD/g de sol pour la lecture à 4h

chez PLHC-1 et de 0,05 pour la lecture à 24h chez les deux lignées démontrant de ce fait une bonne répétabilité des réponses observées et l'homogénéité des échantillons de sol.

Pour les résultats de l'activité biologique des sols, ceux-ci sont en accord avec les résultats obtenus pour les bioessais réalisés par Innovasol où une réponse EROD relativement très marquée et importante est observée pour le sol P9 comparée aux activités beaucoup plus faible pour l'ensemble des trois autres sols (P8, P13 et P16).

Du fait de sa réponse rapide et de la répétabilité des résultats, la lignée PLHC-1 est plus intéressante pour la suite de la démarche cependant la question de sa pertinence biologique peut se poser. En effet, l'utilisation d'une lignée d'un animal aquatique tel que le poisson pour l'étude d'un compartiment terrestre tel que le sol peut sembler illogique. Cependant l'activité EROD fait partie du métabolisme des xénobiotiques dont le rôle est de biotransformer les composés exogènes afin de les rendre plus hydrosolubles et de pouvoir les excréter. La biotransformation se divise en deux phases dont la première consiste à introduire un groupement fonctionnel sur la molécule afin de la rendre plus polaire (Michel, 1993) dans laquelle intervient le cytochrome P450 1A1 responsable de l'activité EROD observée et une seconde phase dite de conjugaison qui vise à conjuguer les métabolites issus de la première phase à des composés hydrosolubles (glutathion, sulfate, acide glucuronique) pour en faciliter l'excrétion (Wessel, 2010). Les gènes associés à ce métabolisme font l'objet d'un polymorphisme interspécifique et interindividuel entraînant une variation de réponse importante entre les espèces (Lewis et al. 1998 ; Hodgson, 2001 ; Oberemm et al. 2005). Cette variation interspécifique ne permet donc pas de dire qu'un organisme modèle dont est originaire la lignée cellulaire soit plus pertinent qu'un autre. Cela revient à considérer ces lignées cellulaires comme des outils de détection plus ou moins performants dans la détection de composés en fonction des caractéristiques intrasèques de l'organisme d'origine.

### 1.3. Conclusion sur l'activité AhR

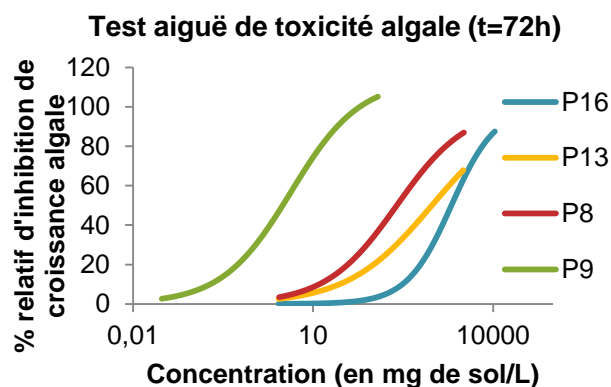
Ces résultats ont permis de choisir la lignée cellulaire PLHC-1 pour le reste de la démarche expérimentale du fait de sa réponse rapide, sa sensibilité et sa répétable face aux contaminants et permettant une détection des molécules responsables de cette activité biologique.

## 2. *Les tests de toxicité aigue*

Les deux tests de toxicité aiguë réalisés sur *Pseudokirchneriella subcapitata* et *Vibrio Fischeri* et à l'INERIS ont donné les résultats décrits ci-dessous.

### 2.1. Inhibition de croissance de *Pseudokirchneriella subcapitata*

Le bioessai montre que les extraits de sols impactent la croissance de colonies algales de *Pseudokirchneriella subcapitata* (Figure 42). Le sol P9 est le plus impactant avec une inhibition de croissance de 20% (CI20) de 0,7 mg de sol sec/L de milieu, suivi du sol P8 (37,9 mg de/L), du P13 (101,8 mg/L) et le P16 (616,8 mg/L) par rapport au témoin négatif seul (0,5% de DMSO).



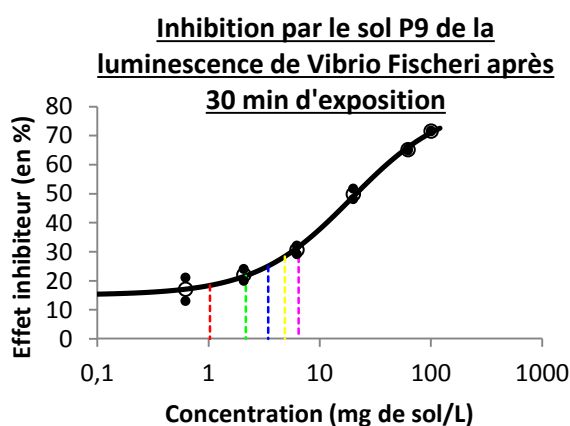
Inhibition de la croissance (CI) :

	CI50 mg de sol sec/L de milieu	CI20 mg de sol sec/L de milieu	CI10 mg de sol sec/L de milieu
<b>P16</b>	2015,7	616,8	308,5
<b>P13</b>	952,4	101,8	27,5
<b>P8</b>	247,8	37,9	12,6
<b>P9</b>	4,3	0,7	0,2

**Figure 42** : Résultats des tests d'inhibition de croissance de l'algue *Pseudokirschneriella Subcapitata*. A gauche : Courbes dose-réponse de l'inhibition de la croissance de la colonie algale, n=3. A droite : représentation des données en inhibition de la croissance (CI).

## 2.2. Le test sur *Vibrio Fischeri* : Le Microtox©

Le microtox© n'a pu être réalisé que sur le sol P9 par manque de temps lors du séjour à l'inertis. Une inhibition de la luminescence émise par cette bactérie est observable et une exposition à des concentrations croissantes a permis d'obtenir une courbe dose-réponse (Figure 43). La CI20 obtenue est de 4,8 mg de sol/L.



Inhibition de la luminescence (CI) :

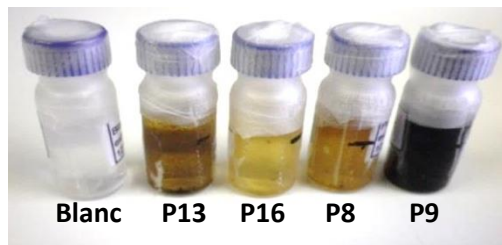
	CI50 en mg de sol/L de milieu	CI20 en mg de sol/L de milieu	CI10 en mg de sol/L de milieu
<b>P9</b>	19,3	4,8	2,2

**Figure 43** : Extinction de la luminescence de *Vibrio Fischeri* après une exposition des bactéries à différentes concentrations de l'extrait du sol P9 (exposition de 30 minutes) ; n=3.

## 2.3. Discussion sur les résultats des deux tests de toxicité aiguë

Les deux bioessais de toxicité aiguë ont répondu en présence des extraits de sol. Les expériences réalisées en triplicat ont montré peu de variation entre les réplicats indiquant la fiabilité de ces bioessais. En comparant ces deux bioessais, le test de croissance algale montre une sensibilité légèrement plus importante que le microtox. De plus, les résultats obtenus sur les quatre sols lors du test de croissance algale montrent la même hiérarchie de réponse que les résultats obtenus avec l'activité AhR confirmant la cohérence des résultats obtenus. Cependant ces deux bioessais n'ont pas été gardés pour la suite de la démarche EDA pour plusieurs raisons d'ordre technique. La première est due au mode de lecture des bioessais qui, contrairement aux tests impliquant l'utilisation de lignées cellulaires, est réalisée alors que

l'extrait est encore présent dans le mélange réactionnel. En effet, du fait du travail en inconnu, les extraits ne subissent pas d'étapes de purification afin d'éviter toute perte de composés entraînant la présence de matière organique qui interfère lors de la lecture de l'absorbance pour le test algal et de la lecture de la luminescence pour le Microtox® pour les extraits les plus colorés (Figure 44).



**Figure 44:** Représentation des extraits obtenus pour chaque sol et du blanc d'extraction lors des extractions ASE pour l'analyse dirigée par les effets. Les sols ont été placés de gauche à droite en fonction de leurs réponses aux bioessais.

La deuxième raison est la sensibilité de ces bioessais. Pour le test algal, le test est réalisé dans des plaques de 24 puits avec un volume par puit de 2,5 mL. Afin de réaliser l'expérience en triplicat par points d'essai, il est nécessaire d'utiliser 40  $\mu\text{L}$  d'extrait/puit soit 120  $\mu\text{L}$  par point (Tableau 34). Or lors du processus de fractionnement par HPLC en EDA, seulement 100  $\mu\text{L}$  de chaque fraction peuvent être dédiés aux bioessais car le reste est consacré aux études chimiques et à la reconstitution d'un pool, ce qui rend incompatible ce bioessais avec la démarche de fractionnement. En ce qui concerne le Microtox®, le volume nécessaire au test reste compatible avec une démarche EDA et a déjà été utilisé lors de cette approche (Hartnik et al. 2007). Il présente cependant une sensibilité plus faible que les deux autres tests avec une CI20 pour le sol P9 à 4,8 mg de sol sec/L de milieu contrairement aux essais sur PLHC-1 et sur la croissance algale de *Pseudokirchneriella subcapitata* où les EC20 et CI20 sont de 0,18 mg de sol sec/L de milieu et de 0.7 mg de sol sec/L de milieu respectivement (Tableau 34). Pour l'utilisation de ces bioessais, deux solutions sont envisageables permettant de diminuer le volume d'extrait utilisé. La première serait d'augmenter la concentration de l'extrait ou la prise d'essai de sol cependant celles-ci ont déjà été ajustées pour éviter la précipitation de l'extrait lors des processus d'extraction et un changement dans ces dernières provoquerait des problèmes de précipitation lors de la préparation de l'échantillon. La deuxième solution est la miniaturisation des bioessais qui permettrait de diminuer les volumes associés. Plusieurs études associées au Microtox® montrent sa miniaturisation dans des plaques 96 puits (Côté et al. 1997 ; Escher et al. 2008 ; Fehn et al. 1997 ; Hirmann et al. 2007) tout comme le test d'inhibition de croissance algale (Environnement Canada, 2007 ; Halm-Lemeille et al. 2014). La miniaturisation des bioessais est envisageable mais il existe une dernière raison importante qui limite l'utilisation de ces bioessais en EDA.

La dernière raison est l'absence de mécanismes de toxicité spécifiques qui rend très difficile l'identification des composés responsables des effets dans le cas d'une réponse positive. En effet, après un fractionnement malgré la simplification du mélange et la séparation des composés dans différentes fractions, plusieurs molécules sont éluées au sein d'une même fraction. Sans mécanisme spécifique associable à des structures moléculaires, l'identification des molécules responsables de la toxicité observée reste laborieuse (Thomas Johnson, 2005).

**Tableau 34** : Comparaison des volumes d'extrait utilisés ainsi que des concentrations efficaces à 20% (EC20 et CI20) entre les différents bioessais de toxicité aiguë et d'activation du récepteur Ah. Les données sont exprimées en mg de sol sec par litre de milieu.

Echantillon	Test sur lignées cellulaires (PLHC-1, AhR)		Test de croissance algale (Pseudokirchneriella subcapitata)		Microtox®	
	Volume (µL pour 3 puits)	EC20	Volume (µL pour 3 puits)	CI20	Volume (µL pour 2 puits)	CI20
P16	3	26,6	120	616,8	N.D	N.D
P13	3	8,2	120	101,8	N.D	N.D
P8	3	1,4	120	37,9	N.D	N.D
P9	3	0,1	120	0,7	10	4,8

#### 2.4. Conclusion sur les tests de toxicité aiguë

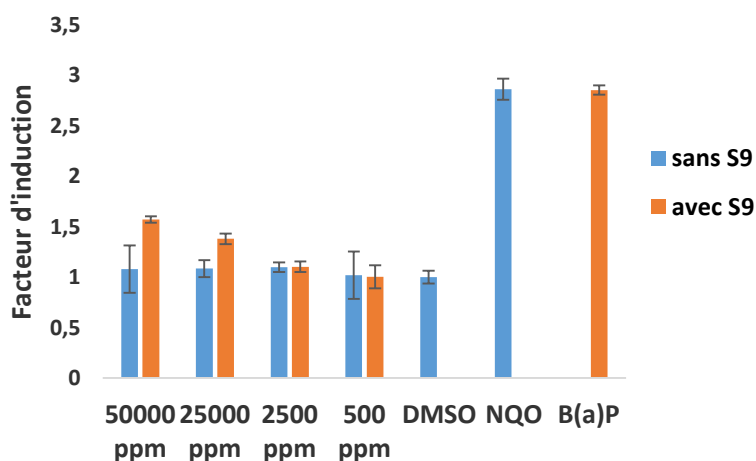
Bien que répondant aux extraits de sol, ces bioessais de toxicité aiguë ne sont pas compatibles avec la démarche EDA utilisée pour ces travaux de thèse. Cependant, ils pourraient être utilisés en complément des bioessais réalisés par la fondation Innovasol pour la détection des zones contaminées au niveau des sites étudiés et leur hiérarchisation.

### 3. SOS-chromotest : la détection de molécules potentiellement génotoxiques

Du fait d'une contamination à la créosote et par conséquent aux HAP des sols du site, le choix a été fait de mettre en place un bioessai portant sur la génotoxicité. En effet, plusieurs HAP sont reconnus comme carcinogènes, génotoxiques et mutagènes (IARC, 1973, 1983, 1984, 1985, 1987, 1989 ; US EPA, 1984b ; Montizaan *et al.* 1989 ; ATSDR, 1994 ; Hughes *et al.* 1997 ; IPCS, 1998 ; WHO, 2001). Ce bioessai permettrait l'identification de nouvelles molécules génotoxiques. Pour cela, l'extrait de sol P9 a été testé pour ce type d'effet grâce au SOS-Chromotest.

#### 3.1. Résultats

Le SOS-chromotest est considéré comme positif lorsque le facteur d'induction est supérieur ou égal à 1,5 (Quillardet et Hofnung, 1993). L'extrait de sol atteint ce facteur d'induction uniquement après activation métabolique et pour la concentration de 2,8 g de sol sec/L de milieu (Figure 45).



**Figure 45** : Résultats du SOS-chromotest sur le sol P9. B(a)P : témoin positif après activation métabolique. NQO : témoin positif sans activation métabolique. DMSO : témoin négatif.

50 000 parti par million (ppm) : extrait du sol P9 à 2,809 g de sol sec/L (concentration dans les puits).

### 3.2. Discussion

Le SOS-Chromotest permet la détection de molécules génotoxiques. L'extrait de sol testé présente un facteur d'induction de 1,5, seuil à partir duquel une molécule ou un extrait sont considérés comme génotoxiques modérés (Mersch-Sundermann et al., 1992). Ce niveau d'induction n'est atteint qu'après une activation métabolique par du S9 de rat indiquant que les molécules présentes dans l'extrait de sol ont besoin d'être métabolisées avant d'être à l'origine d'atteintes à l'ADN. Le sol étudié est contaminé par de la créosote, un mélange riche en HAP. Or les HAP présentent leur génotoxicité après métabolisation en époxyde (Phillips, 1999 ; Tarantini, 2009). La génotoxicité observée est certainement due à ce type de molécules.

Ce bioessai a déjà montré sa capacité à détecter des molécules génotoxiques dans le cas de sédiments contaminés et plus particulièrement de la génotoxicité liée aux HAP et à des composés organiques polaires (Baran et Tarnawski, 2013 ; Cachot et al. 2006 ; Mamindy-pajany et al., 2012). Cependant ce test nécessite un contrôle positif basé sur du benzo(a)pyrène de 1,7 mg/L contrairement au test AhR où il est de 7,7 µg/L montrant son manque de sensibilité. De plus pour obtenir leurs résultats, Cachot et al. (2006) ont réalisé une extraction sur 50g de sédiment repris ensuite dans 1 ml de diméthyl-sulfoxyde ce qui correspond à une concentration de 50 000g de sédiment équivalent par litre de DMSO. Cette concentration est importante ; pour les travaux réalisés dans cette thèse les concentrations des extraits de sols sont comprises entre 55g de sol équivalent par litre de DMSO pour les sols les plus contaminés et 300 g de sol équivalent par litre de DMSO pour les sols les moins contaminés (sols témoins). Ce bioessai nécessite une concentration importante des extraits due à son manque de sensibilité ce qui n'est pas compatible avec l'analyse de la matrice « sol » pour laquelle la concentration de l'extrait est limitée.

### 3.3. Conclusion

Le SOS-Chromotest permet d'identifier des effets génotoxiques de molécules pures et d'extraits environnementaux liquides. Cependant le faible niveau de sensibilité de ce bioessai n'est pas compatible avec la matrice étudiée et ne peut être employé par la suite pour une démarche d'analyse dirigée par l'effet.

## **4. Conclusion sur les biotests et leur compatibilité avec la démarche EDA**

Le Tableau 35 résume les résultats des différents bioessais testés lors de cette étude. Les tests les plus intéressants pour une analyse dirigée par l'effet restent les bioessais impliquant l'utilisation de récepteurs cellulaires qui permettent une identification plus simple des composés actifs du fait de leur spécificité d'action. Le microtox© est aussi régulièrement utilisé en EDA (Reemtsma et al. 1999 ; Reineke et al. 2002 ; Hartnik et al. 2007). Cependant du fait de son manque de spécificité, l'identification des molécules responsables des effets observés reste difficile ce qui conduit à l'absence d'étape de confirmation lors de ces études (Reemtsma et al. 1999 ; Reineke et al. 2002 ; Hartnik et al. 2007).

**Tableau 35** : Résumé des différents bioessais testés avec leurs spécificités et leur compatibilité avec la démarche EDA.

Biotests	Sensibilité	Quantité d'extrait nécessaire	Spécificité	Compatibilité EDA?
Test de fixation à un récepteur cellulaire (lignées cellulaires)	Forte	Faible	Identification de molécules avec des effets spécifiques (aide à l'identification de structures moléculaires)	Oui
Test inhibition de croissance algale	moyenne	Importante	Identification de molécules toxiques sans spécificité d'action	Non/ Oui (possibilité de miniaturisation)
Microtox©	moyenne	Faible	Identification de molécules toxiques sans spécificité d'action	Oui
SOS-Chromotest	Faible	Faible	Identification de molécules génotoxiques	Non

## II. Les tests méthodologiques pour l'approche EDA

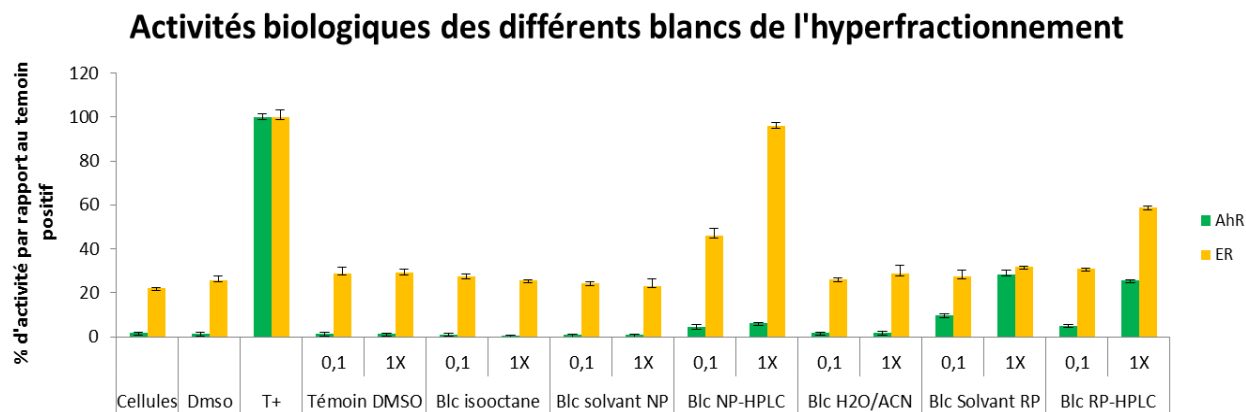
Les tests méthodologiques ont principalement porté sur la méthode de fractionnement des échantillons.

### 1. Comparaisons entre un fractionnement en phase normale et en phase inverse

Comme indiqué dans la partie méthodologie (V.3. Expérience afin de sélectionner le type de fractionnement en HPLC à appliquer sur les sols étudiés), les deux principales méthodes de fractionnement (phase normale et phase inverse) ont été testées sur une solution de composés connus et possédant une activité AhR et ER.

La Figure 46 représente les activités ER et AhR de blancs protocoles après différentes étapes du fractionnement. Comme le montre cette figure, certaines étapes du fractionnement peuvent être sources de contamination des échantillons. Pour l'activité ER, la source possible de contamination des échantillons est le système de fractionnement HPLC qui peut relarguer des molécules à activité œstrogénique n'ayant pas été éliminées du système que ce soit en phase normale ou en phase inverse. Cette contamination peut être évitée en injectant une série de plusieurs blancs avant et après chaque échantillon fractionné (nettoyage du système). Pour l'activité AhR, une contamination est observable en phase inverse uniquement au niveau du blanc solvant RP qui correspond au volume d'élution sans passage dans le système HPLC et du blanc RP-HPLC qui est passé dans le système HPLC (Figure 46). Le fait que ces deux types de blanc soient contaminés indique que la contamination de l'extrait provient de l'étape de concentration des fractions par évaporation sous flux d'azote. Cette activité est observable à 4h d'exposition mais disparaît après 24h d'exposition des cellules PLHC-1. Cette contamination des blancs est donc due à des HAP métabolisables par les cellules. Le fractionnement en phase inverse fait intervenir une phase mobile composée d'eau et d'acétonitrile tandis que la phase normale est composée de n-pentane, de dichlorométhane et d'acétonitrile. L'eau et l'acétonitrile ont des températures d'ébullition élevées de 100 et 82°C respectivement contrairement au n-pentane et au dichlorométhane qui ont des températures

d'ébullition plus faibles de 36 et 40°C respectivement. Il en découle que la concentration des fractions en phase inverse est plus longue laissant ainsi plus de temps aux HAP atmosphériques d'arriver à un état d'équilibre entre l'atmosphère et le liquide des fractions. Ceci peut expliquer pourquoi les blancs associés à la phase inverse ayant subi l'étape de concentration sous flux d'azote présentent une contamination observable pour l'activité AhR.



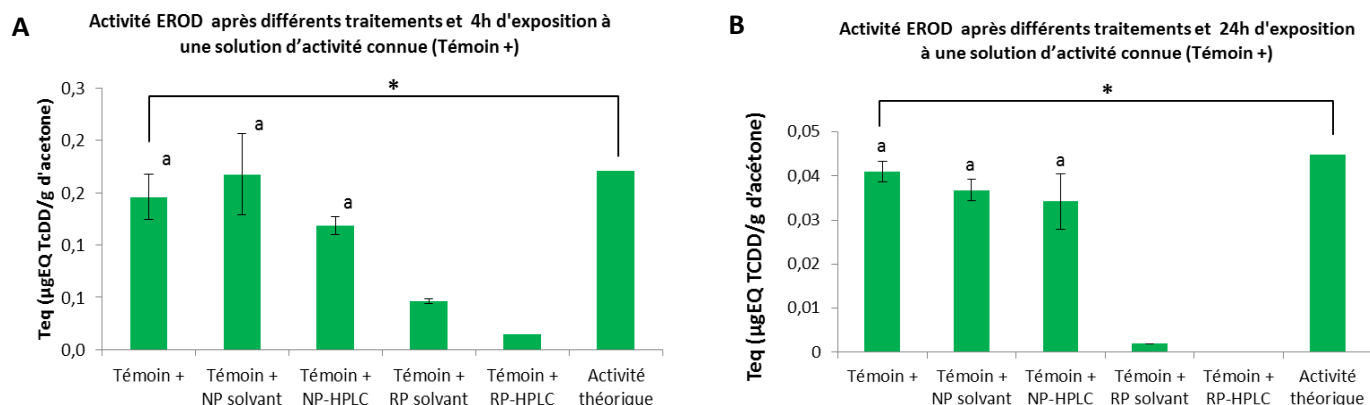
**Figure 46** : Activités AhR et ER des différents blancs réalisés durant l'expérience liées au choix de la méthode de fractionnement. T+ : témoin positif. Témoin DMSO : test d'activité pour le solvant utilisé lors de l'exposition des cellules. Blc isooctane : blanc du solvant d'injection utilisé en HPLC en mode normal. Blc solvant NP : blanc reconstituant le gradient d'élution en phase normale sans passage dans le système HPLC. Blc NP-HPLC : blanc associé au fractionnement en phase normale. Blc H<sub>2</sub>O/ACN : blanc du solvant d'injection utilisé en HPLC en mode inverse. Blc solvant RP : blanc reconstituant le gradient d'élution en phase inverse sans passage dans le système HPLC. Blc RP-HPLC : Blanc associé au fractionnement en phase inverse.

La solution de composition connue (voir Tableau 30) et dont l'activité a été déterminée grâce à l'utilisation de facteurs d'équivalent toxiques (TEF) a ensuite été testée biologiquement après différents traitements (Figures 47 et 48). Pour l'activité AhR aucune différence significative n'a été trouvée pour la solution sans traitement (Témoin +) et l'activité théorique ce qui signifie que le modèle additif fonctionne pour les mélanges simples (ici la solution est composée de 4 molécules à activité AhR : PCB 126 ; 2,3,7,8-TCDD ; Dibenzo[ah]anthracene et Benzo[k]fluoranthène). Après les différents traitements associés à un fractionnement en phase normale, aucune différence significative n'est observable indiquant que ce mode de fractionnement limite les pertes d'activité et par conséquent, les pertes de composés des extraits testés. En ce qui concerne l'activité AhR associée à un fractionnement en phase inverse, une perte significative d'activité supérieure à 33% est obtenue que ce soit pour les témoins + RP solvant (solution ajoutée au volume d'élution et évaporés sans passant dans le système HPLC) ou Témoin + RP-HPLC (solution injectée en HPLC). Cette perte d'activité est effective après 4h d'exposition mais aussi après 24h (Figure 47 A et B). Cette perte d'activité indique que les composés présents dans la solution initiale qu'ils soient métabolisables ou non par les cellules, ont été perdus lors des différents traitements associés à ce type de fractionnement. Tout comme les blancs préalablement testés, le fait que les deux témoins positifs associés à cette méthode de fractionnement aient une perte d'activité indique que l'étape à l'origine des pertes des composés est l'étape de concentration des échantillons sous flux d'azote. Tout comme précisé précédemment, le temps de concentration des fractions associé à la phase inverse est plus long permettant aux molécules de se volatiliser avant évaporation de la phase mobile. De plus les molécules présentes dans la solution test ont un log de Kow supérieur à 6 indiquant leur hydrophobicité et leur manque d'affinité avec ce type de phase mobile hydrophile. Ceci peut être à l'origine de phénomènes d'absorption de ces

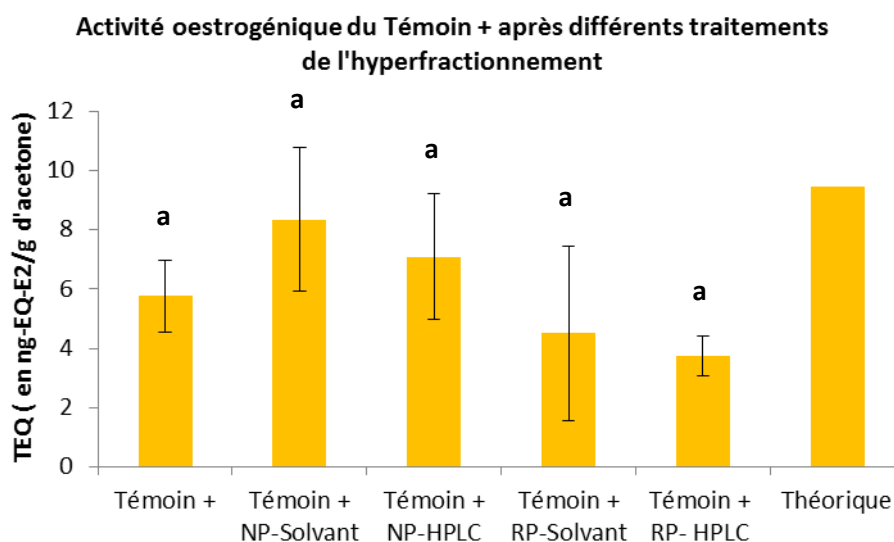


molécules sur les parois des flacons accentuant leur perte lors de la phase de concentration des échantillons.

Pour l'activité œstrogénique de la solution composée d'estrone, d'œstradiol, de bisphénol A, de 4t-octylphenol et de DDT, aucune différence significative d'activité n'a été observée pour l'ensemble des traitements associés à l'échantillon.



**Figure 47** : Activité AhR de la solution d'activité connue à différentes étapes du fractionnement et après 4h (A) et 24h (B) d'exposition. Témoin + : solution testée sans aucun traitement. Témoin + NP solvant : solution avec reconstitution du gradient d'élution en phase normale sans passage dans le système HPLC. Témoin + NP-HPLC : solution ayant subi l'ensemble du processus de fractionnement en phase normale. Témoin + RP solvant : solution avec reconstitution du gradient d'élution en phase inverse sans passage dans le système HPLC. Témoin + RP-HPLC : solution ayant subi l'ensemble du processus de fractionnement en phase inverse. L'activité théorique est obtenue en utilisant le modèle additif et les facteurs d'équivalents toxiques (TEF) des molécules présentes dans la solution testée. Le témoin + a été testé sous n=6 et l'ensemble des autres extraits sous n=3. \* : Pas de différence significative pour  $p > 0,05$  selon le test t-de Student (comparaison d'une moyenne à une moyenne théorique). a : Pas de différence significative selon le test non paramétrique de Mann-Whitney.

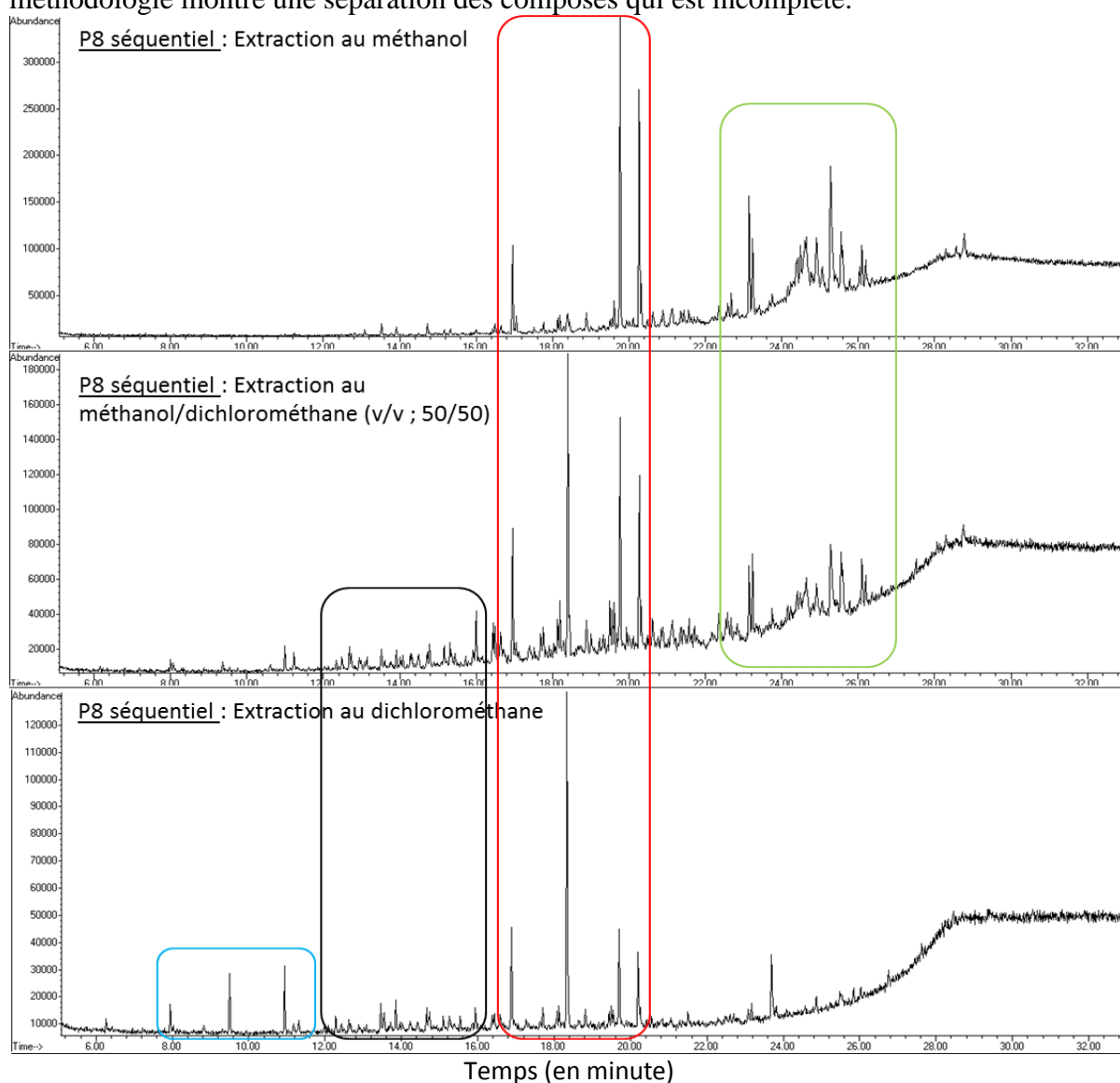


**Figure 48** : Activité œstrogénique de la solution d'activité connue à différentes étapes du fractionnement après 16h d'exposition. Témoin + : solution testée sans aucun traitement. Témoin + NP solvant : solution avec reconstitution du gradient d'élution en phase normale sans passage dans le système HPLC. Témoin + NP-HPLC : solution ayant subi l'ensemble

du processus de fractionnement en phase normale. Témoin + RP solvant : solution avec reconstitution du gradient d'élution en phase inverse sans passage dans le système HPLC. Témoin + RP-HPLC : solution ayant subi l'ensemble du processus de fractionnement en phase inverse. Le témoin + a été testé sous n=6 et l'ensemble des autres extraits sous n=3. L'activité théorique est obtenue en utilisant le modèle additif et les facteurs d'équivalents toxiques (TEF) des molécules présentes dans la solution testée.

## 2. Vérification de l'additivité des effets sur une extraction séquentielle par ASE

Une extraction séquentielle par ASE a été réalisée afin de vérifier si une séparation des composés est possible dès l'extraction (voir la partie méthodologie III.2. Choix de l'extraction accélérée par solvant et la méthode employée). Cependant le couplage entre ce type d'extraction et le fractionnement par HPLC aurait été à l'origine d'une préparation longue de l'échantillon et d'une redondance dans l'analyse. En effet comme le montre la Figure 49, cette méthodologie montre une séparation des composés qui est incomplète.

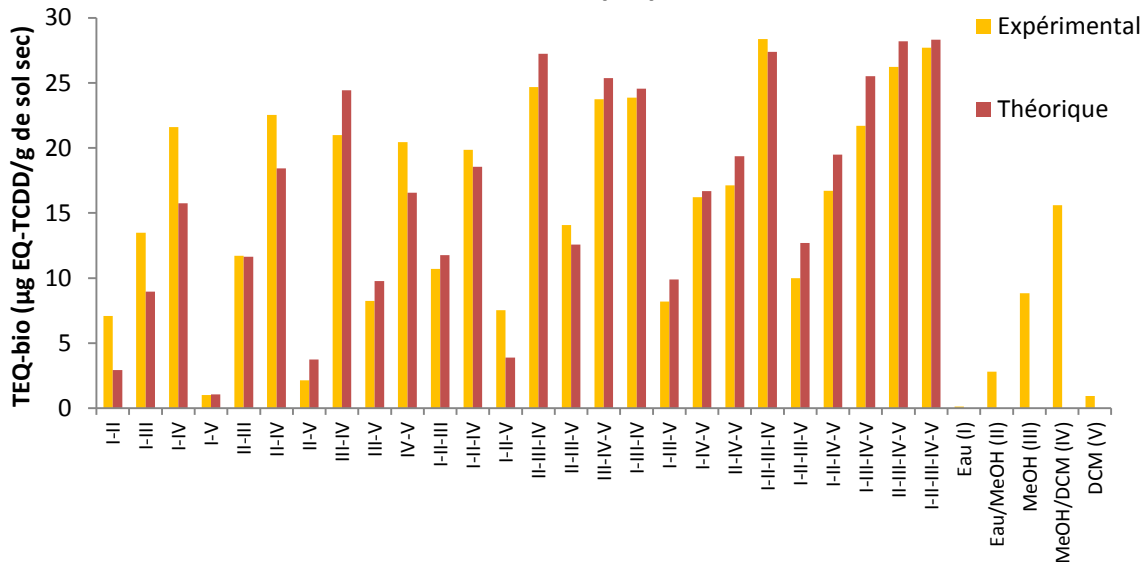


**Figure 49** : Profil chromatographique des fractions Méthanol, Méthanol/Dichlorométhane (v/v ; 50 :50) et Dichlorométhane du sol P8 après une extraction séquentielle. Profil obtenu en GC-MS en mode balayage. Les encadrés indiquent les pics chromatographiques en commun entre les différentes extractions.

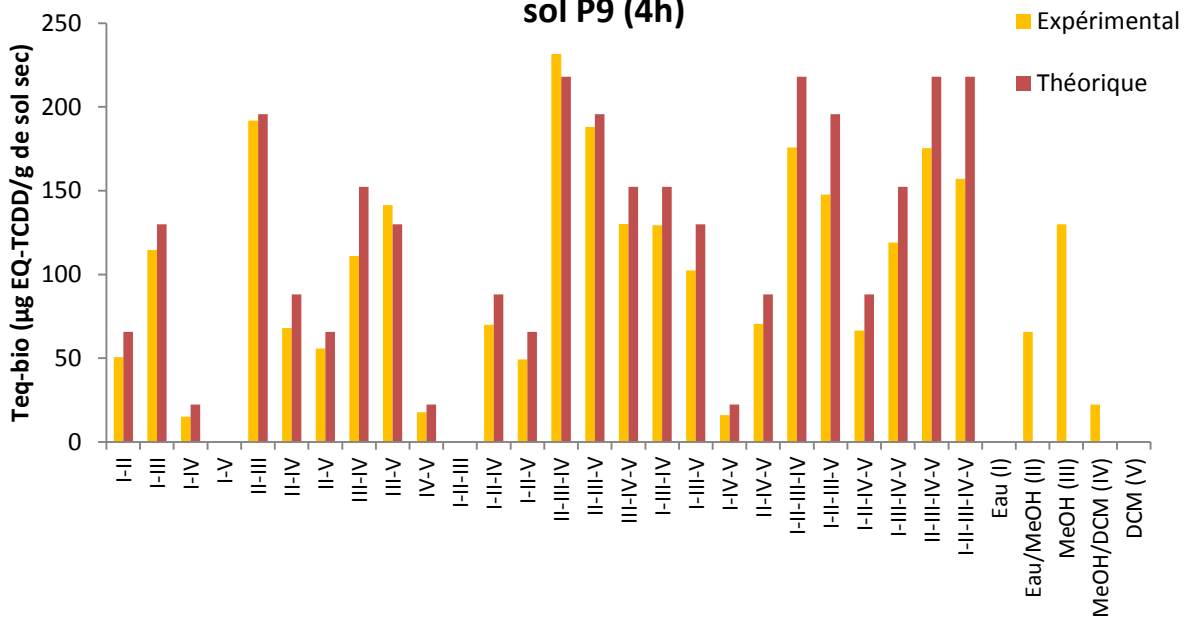
Cette expérience de séparation de composés par extraction séquentielle a servi à vérifier si la théorie d'additivité des effets était respectée pour les fractions de deux sols présentant deux niveaux de contamination différents : le sol P9 (très contaminé) et le sol P8 (peu contaminé). Les résultats sont représentés Figures 50 et 51. Dans la Figure 54, les résultats des différentes activités AhR des fractions sont représentés ainsi que les résultats théoriques et expérimentaux des 26 regroupements de fractions possibles. Pour l'extraction séquentielle, une séparation de l'activité est observable entre les 5 fractions d'extraction. Pour les 2 sols, la fraction d'extraction liée à l'eau ne présente pas d'activité indiquant que les molécules à l'origine de l'activité AhR ne sont pas extractibles par ce solvant. Les molécules responsables de l'activité AhR sont des composés aromatiques polycycliques (CAP) tel que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) qui sont peu polaires et hydrophobes. La créosote étant composée principalement de HAP, il est donc normal que cette fraction soit inactive. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus pour les tests de fractionnement par HPLC en phase inverse et du manque d'affinité de la phase inverse avec le type de contaminants étudiés. Pour les autres fractions, une répartition de l'activité est observable entre elles avec un profil différent entre le sol P9 et le sol P8. Pour le sol P8, l'extraction la plus active est celle au Méthanol/DCM (50/50 ; v/v), mélange utilisé pour une extraction complète des contaminants présentée dans la partie méthodologie et déjà testée par Creusot (2011). Le fait que les fractions au dichlorométhane soient peu actives que ce soit pour le sol P8 ou le sol P9 montre que le mélange de solvant (MeOH/DCM ; 50/50 ; v/v) permet une extraction plus complète des contaminants confirmant les résultats de Creusot (2011). La différence de profil entre les extractions séquentielles des deux sols se trouve dans les extractions à l'Eau/Méthanol (50/50 ; v/v), Méthanol et Méthanol/DCM (50/50 ; v/v) où le sol P9 présente une activité AhR plus importante pour les fractions eau/Méthanol et Méthanol par rapport à l'extraction Méthanol/DCM (50/50 ; v/v) et relativement au sol P8. Les fractions Eau/Méthanol et Méthanol sont plus polaires que la fraction Méthanol/DCM. Ce résultat suppose que l'activité AhR du sol P9 est due aux HAP mais également à d'autres composés présentant une polarité plus importante que ce type de composés.

En ce qui concerne la vérification de l'additivité des effets entre les fractions, les activités théoriques et expérimentales des différents regroupements de fractions montrent une bonne corrélation pour les deux sols ( $R^2= 0,926$  pour le sol P9 et  $R^2=0,893$  pour le sol P8) (Figure 55). Ces résultats vont dans le sens du respect de l'additivité des effets pour l'activité AhR entre les fractions. Il sera donc possible de comparer les résultats biologiques entre les extraits bruts et la somme de l'activité des fractions afin de vérifier la non-perte de composés lors des futurs fractionnements.

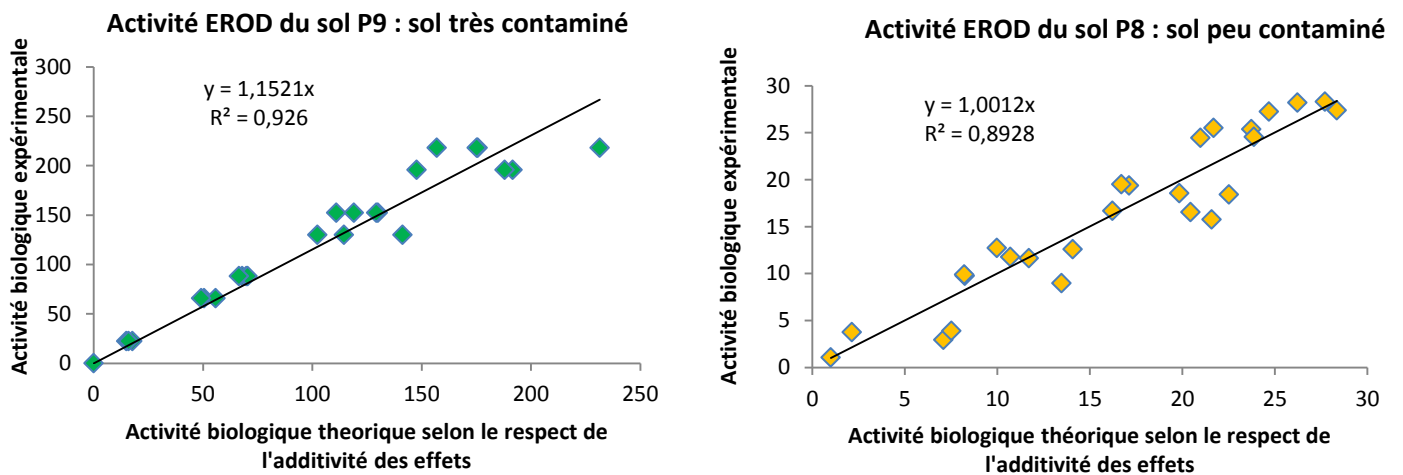
### Expérience d'additivité des effets pour l'activité EROD sur le sol P8 (4h)



### Expérience d'additivité des effets pour l'activité EROD sur le sol P9 (4h)



**Figure 50** : Résultats de l'expérience d'additivité des effets pour l'activité EROD (après quatre heures d'exposition). Les résultats théoriques (en rouge) sont obtenus en réalisant la somme des activités biologiques des différentes extractions et sont comparés à ceux obtenus expérimentalement (en orange) pour le sol P9 (sol très contaminé) et le sol P8 (sol peu contaminé). Les mélanges de solvant suivent les proportions suivantes, 50/50 ; v/v.



**Figure 51** : Corrélation entre l'activité EROD théorique et expérimentale des différents regroupements des extractions séquentielles des sols P8 et P9 (après 4h d'exposition)

### 3. Conclusion sur les tests d'extraction et de fractionnement

Les résultats de ces expériences ont permis de choisir la stratégie de préparation des échantillons pour une analyse dirigée par l'effet sur des sols. L'étude est réalisée grâce à une extraction large des contaminants des sols par une extraction ASE impliquant un mélange Méthanol/DCM (50/50 ; v/v) suivi d'un fractionnement par HPLC en phase normale compatible avec les contaminants étudiés et les solvants utilisés. L'extraction séquentielle montre que l'additivité des effets est respectée lors d'une séparation incomplète des contaminants, ce qui permet d'appliquer la théorie additive aux extraits.

Le fractionnement en phase inverse est plus compatible avec les matrices liquides et des contaminants plus polaires et hydrophiles. Bien que son intérêt soit moins important pour l'étude des sols étudiés dans cette thèse, elle pourrait être utile dans les cas de contamination des eaux souterraines des sites industriels qui pourraient renfermer des contaminants plus polaire que les sols situés au dessus de ces eaux.

**II. Mise en œuvre de l'EDA : Première étape, criblage des sols en vue de sélectionner les sols à fractionner**

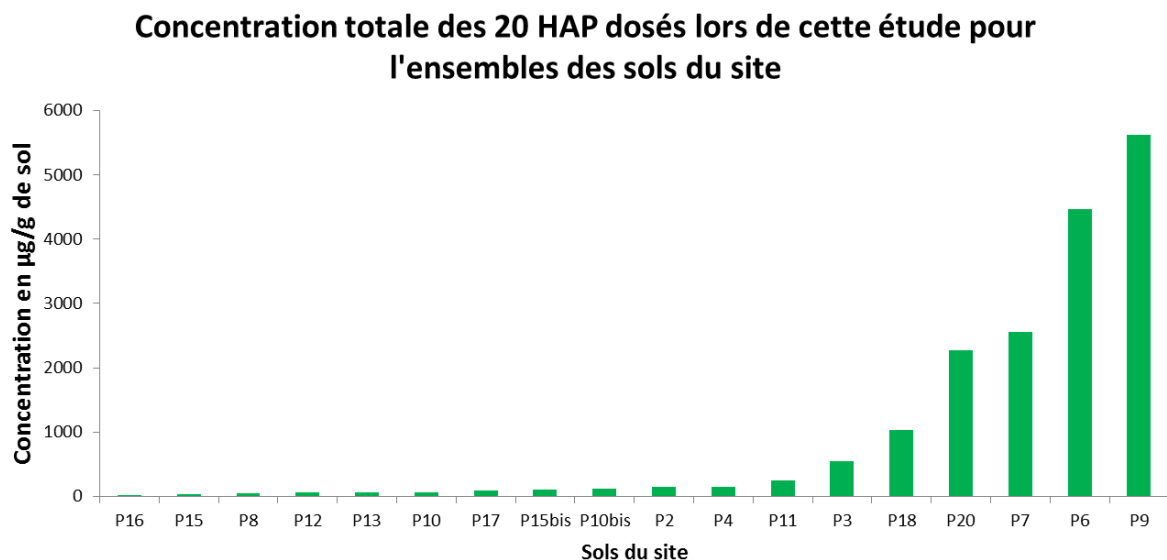
Les tests de développement ont permis de sélectionner le type de bioessais, la méthode d'extraction ainsi que la méthode de fractionnement à appliquer aux sites étudiés. Dans ce chapitre, les résultats de la démarche sont présentés. Pour les deux sites industriels, les résultats font l'objet d'articles scientifiques également présentés dans ce chapitre.

### I. Criblage des sols du site contaminé par la créosote pour sélectionner le sol le plus pertinent à fractionner et pour une analyse chimique plus poussée.

Comme indiqué dans la partie méthodologie, un criblage composé d'analyses chimiques et biologiques permet de sélectionner le ou les sol(s) les plus pertinents à fractionner. Les résultats de ce criblage sont les suivants pour le site d'étude contaminé par la créosote.

#### 1. Dosage des HAP et PCB

Pour ce site d'étude, les analyses en GC/ECD n'ont pas permis de détecter les PCB étudiés (voir Tableau 20) dont les concentrations sont en dessous des limites de quantification. Seul des HAP ont pu être détectés. Les résultats sont présentés Figure 52 et Tableau 36.



**Figure 52** : Concentration (en µg/g de sol sec) des 20 HAP dosés pour les sols du site contaminé par la créosote.

Les sols échantillonnés sur le site présentent une contamination en HAP. Les différences de concentrations entre les sols sont importantes avec des valeurs comprises entre 24 µg de HAP/g de sol sec (pour le sol le moins contaminé) et 6525 µg de HAP/g de sol sec (pour le sol le plus contaminé). Pour les sols les plus contaminés (P6, P7 et P9), il s'agit des sols échantillonnés dans la zone d'égouttage des traverses de chemin de fer où de la créosote est régulièrement déversée. Ces sols présentent une concentration importante en phénanthrène, fluoranthène et pyrène qui sont les principaux constituants de la créosote (Sundström et al., 1986) et sont en accord avec les profils de contamination associés à la créosote des sols obtenu par Moret et al. (2007). La contamination du sol P20 reste difficilement explicable car ce sol correspond à un témoin situé en périphérie du site d'étude et ne devrait pas présenter un tel niveau de contamination. Il est possible d'un dépôt ancien ou involontaire soit à l'origine d'une telle concentration en HAP dans ce sol (2274,2 µg de HAP/g de sol sec). Pour le sol P18, il se situe dans une zone de remblais de mâchefers ce qui pourrait expliquer sa concentration importante en HAP (1027 µg de HAP/g de sol sec). Le sol P3 se situe à proximité de traverses à égoutter et des traces récentes de créosote ont été observées

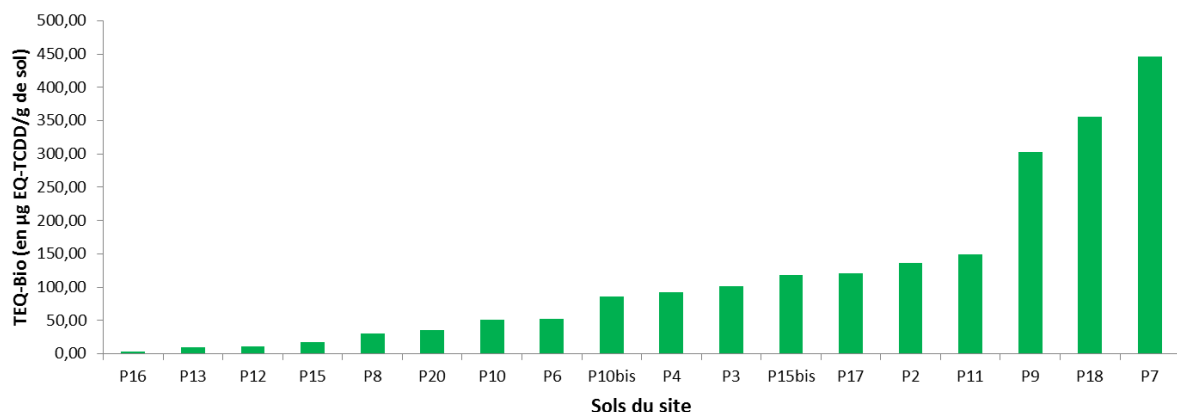
expliquant son niveau de contamination et la concentration en HAP totaux de 542,5 µg de HAP/g de sol sec. Pour les autres sols, des concentrations nettement plus faibles en HAP sont observables (inférieures à 250 µg de HAP/g de sol sec) ce qui est en accord avec leur localisation au niveau du site se trouvant hors des zones d'utilisation de la créosote.

D'un point de vue qualitatif, le phénanthrène, le fluoranthène et le pyrène ont généralement des concentrations plus importantes que les autres HAP au niveau des sols (voir Tableau 36) et représentent entre 24 et 85% de la concentration en HAP totaux dans les sols. Cependant quelques différences sont observables comme pour les sols P6 et P20, contaminés principalement pas des HAP léger (nombre de cycles  $\leq 4$ ) qui représentent 97 et 96% de la concentration en HAP de ces sols, respectivement et où les concentrations en HAP lourds (nombre de cycles  $>4$ ) sont très faibles. A contrario, pour les sols P7 et P18 les concentrations en HAP lourds sont très importantes (voir Tableau 36) et représentent, par exemple 50% des HAP totaux dans le sol P18. Ces sols ont ensuite été testés pour leur activité biologique.

## 2. Analyse biologique des sols

Les sols n'ont pas présenté d'activité œstrogénique. Seule une activité AhR a pu être observée. Les résultats sont présentés Figure 53. Tout comme pour l'analyse des HAP, une hiérarchisation de l'activité biologique est observable entre les sols. Les trois sols P9, P18 et P7 présentent une activité supérieure aux autres avec une TEQ-bio supérieure à 300 µg EQ-TCDD/g de sol sec. Une différence de hiérarchisation entre cette analyse biologique et la concentration en HAP des sols est observable. En effet, les sols P6 et P20 qui étaient très contaminés en HAP présentent une activité AhR peu importante par rapport aux autres sols (TEQ-bio  $\approx 50$  µg EQ-TCDD/g de sol). Comme précisé précédemment dans ce document, les sols P6 et P20 sont plus contaminés par des HAP légers alors que les sols P7 et P18 le sont par des HAP lourds. Or l'activité AhR est induite majoritairement par les HAP lourds (Louiz et al., 2008) ce qui pourrait expliquer cette différence dans la hiérarchisation des sols pour ces deux analyses. En ce qui concerne les autres sols, leur concentration en HAP est cohérente avec le niveau de réponse obtenue pour leur activité AhR (voir tableau 36).

**Activité AhR/EROD des sols du site d'étude après 4h d'exposition des cellules PLHC-1**



**Figure 53** : Activité AhR des différents sols du site de créosotage après 4h d'exposition. Les données sont exprimées en µg EQ-TCDD/g de sol sec. n=1 : les échantillons ont été analysés en un seul replicat pour réaliser un criblage rapide.



**Tableau 36** : Concentration de 18 HAP et de 2 composés aromatiques polycycliques soufrés (en µg/g de sol sec) dans les sols du site contaminé par la créosote. Les concentrations totales en HAP légers et lourds sont également indiquées ainsi que les TEQ-Bio. Les HAP en noir correspondent aux 16 HAP de la liste de l'US-EPA. b : HAP reconnus comme cancérigènes pour l'Homme

	P16	P13	P12	P15	P8	P20	P10	P6	P10bis	P4	P3	P15bis	P17	P2	P11	P9	P18	P7
Naphtalène	0,09	0,68	<LQ	0,09	0,88	0,20	0,18	<LQ	0,51	1,18	2,20	0,41	0,75	0,97	0,50	2,51	9,33	1,19
Phénanthrène	5,63	12,96	24,52	9,21	7,74	541,82	10,23	1085,4	12,67	20,03	54,56	11,01	11,72	21,32	15,22	1220,4	40,02	85,54
Anthracène	0,95	0,81	<LQ	<LQ	0,71	56,07	2,18	233,39	1,94	4,01	15,75	1,51	1,65	3,25	2,52	105,02	16,85	53,83
Acénaphthylène	0,25	0,21	0,23	0,23	0,69	3,51	0,77	9,32	1,95	1,90	5,35	1,48	0,92	1,38	1,98	8,37	7,50	25,55
Acénaphtène	1,89	5,54	3,51	1,73	4,45	60,14	2,01	222,31	3,02	8,33	24,34	5,69	3,29	15,19	5,20	186,53	23,12	62,18
Fluorène	2,48	6,15	5,70	2,28	3,87	96,52	2,66	298,16	2,83	7,71	17,70	3,34	3,21	10,17	5,07	261,52	14,92	36,37
Fluoranthène	4,88	8,78	9,81	3,96	7,79	845,71	11,54	1526	15,80	22,51	135,06	12,05	12,77	17,14	28,26	1912,7	106,68	1014,5
Pyrène	3,18	6,35	4,30	2,58	6,39	547,51	7,03	890,24	11,42	18,23	103,11	9,36	9,34	13,01	24,15	1468	103,09	1008
Benzo(a)anthracène <sup>b</sup>	0,36	1,64	0,47	0,66	2,15	9,79	3,02	25,00	9,95	7,16	21,01	7,12	5,86	5,63	22,68	42,42	77,87	28,19
Chrysène <sup>b</sup>	1,11	2,16	1,86	1,31	3,02	7,86	3,77	21,13	9,59	8,22	26,30	7,38	6,88	7,08	18,69	73,33	92,16	46,47
2,1-Benzonaphthothiophène	0,10	0,35	0,33	0,34	0,43	7,45	0,97	19,69	2,79	1,99	7,56	1,87	1,94	2,06	4,74	23,92	25,85	27,05
<b>BjF+ BkF<sup>b</sup>+BbF</b>	1,26	4,18	1,82	3,06	5,33	6,09	7,43	<LQ	18,16	18,70	50,55	14,56	12,08	17,08	39,18	64,47	229,32	71,38
Benzo(e)pyrène	0,46	1,77	0,90	1,29	2,33	2,40	3,02	<LQ	7,22	7,61	20,04	5,97	4,76	7,41	15,76	24,88	89,28	24,87
Benzo(a)pyrène <sup>b</sup>	0,17	1,79	0,52	0,92	2,11	1,14	2,62	<LQ	7,45	5,56	14,11	6,30	4,06	4,77	18,26	9,20	52,95	11,46
Pérylène	0,04	0,45	<LQ	<LQ	0,45	<LQ	1,05	<LQ	2,73	2,45	5,09	2,46	1,45	2,22	6,91	2,24	25,60	5,99
Indeno(1,2,3-cd)pyrène <sup>b</sup>	0,14	1,19	<LQ	1,01	1,77	1,56	3,55	<LQ	8,49	7,54	18,84	7,30	4,72	7,65	22,26	7,83	65,37	30,16
Dibenzo(ah)anthracène <sup>b</sup>	0,03	0,28	<LQ	<LQ	0,36	<LQ	0,59	<LQ	2,07	1,90	5,93	1,66	1,19	1,72	4,75	1,71	16,33	5,50
Benzo(g,h,i)perylène	0,14	1,40	0,53	1,04	1,75	1,15	1,98	<LQ	4,89	4,20	9,96	4,28	2,73	4,38	11,66	7,67	26,99	14,58
Dibenzothiophène	0,89	1,91	2,52	0,81	1,03	85,31	1,12	140,35	1,34	2,12	5,02	1,25	1,34	2,22	1,37	202,62	3,59	8,78
<b>∑HAP</b>	<b>24,05</b>	<b>58,60</b>	<b>57,01</b>	<b>30,50</b>	<b>53,25</b>	<b>2274,2</b>	<b>65,72</b>	<b>4470,9</b>	<b>124,82</b>	<b>151,36</b>	<b>542,48</b>	<b>104,97</b>	<b>90,64</b>	<b>144,65</b>	<b>249,17</b>	<b>5625,4</b>	<b>1026,8</b>	<b>2561,6</b>
<b>∑HAP légers</b>	<b>21</b>	<b>46</b>	<b>51</b>	<b>22</b>	<b>38</b>	<b>2177</b>	<b>44</b>	<b>4331</b>	<b>72</b>	<b>101</b>	<b>413</b>	<b>61</b>	<b>58</b>	<b>97</b>	<b>129</b>	<b>5305</b>	<b>517</b>	<b>2389</b>
<b>∑HAP lourds</b>	<b>2</b>	<b>11</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>12</b>	<b>20</b>	<b>0</b>	<b>51</b>	<b>48</b>	<b>125</b>	<b>43</b>	<b>31</b>	<b>45</b>	<b>119</b>	<b>118</b>	<b>506</b>	<b>164</b>
<b>Teq-BIO (µgEQ-TCDD/g de sol sec)</b>	<b>3</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>18</b>	<b>30</b>	<b>35</b>	<b>51</b>	<b>52</b>	<b>86</b>	<b>92</b>	<b>101</b>	<b>119</b>	<b>121</b>	<b>136</b>	<b>149</b>	<b>303</b>	<b>356</b>	<b>446</b>

En appliquant une analyse d'équilibre des masses basée sur les 16 HAP de la liste US-EPA, leur part de responsabilité dans l'activité biologique expérimentale a pu être estimée (Tableau 37). L'activité expliquée par ces composés ne dépasse pas les 10% quel que soit le sol considéré. L'activité AhR obtenue est donc liée à la présence d'autres molécules présentes dans ces sols. Ces résultats montrent que si les HAP et plus particulièrement le phénanthrène, le fluoranthène, le fluorène, l'acénaphène, le pyrène et le chrysène sont les principaux composants de la créosote, ils n'expliquent pas l'activité biologique obtenue qui est donc liée à d'autres molécules présentes dans ce mélange complexe et qui pourtant n'en sont pas les constituants majoritaires ce qui confirme la différence de classement obtenue entre celui basé sur les concentrations et celui basé sur les TEQ-Bio. Ces résultats montrent l'intérêt de la mise en place d'une analyse dirigée par l'effet pour obtenir une caractérisation chimique plus poussée de la contamination de ces sols et l'identification de molécules impliquées dans l'activité AhR observée.

**Tableau 37** : Activité biologique théorique (Teq-chim) due aux 16 HAP de la liste US-EPA et expérimentaux (TEQ-bio) des sols du site de créosotage. L'activité biologique théorique a été déterminée grâce aux facteurs d'équivalent toxique (TEF) de Louiz et al. (2008) impliquant la 2,3,7,8-TCDD comme molécule de référence. N.D : Non déterminé

Sol	TEQ-chim (µg EQ TCDD/g de sol)	Rang TEQ-chim	TEQ-bio (µg EQ TCDD/g de sol)	Rang TEQ-chim	Pourcentage expliqué (en %)
P16	0,2	17	2,8	18	6,5
P13	0,7	14	9,5	17	7,0
P12	0,3	16	10,4	16	2,5
P15	0,4	15	17,9	15	2,5
P8	0,9	13	29,9	14	2,9
P20	1,1	12	35,3	13	3,1
P10	1,2	11	51,5	12	2,4
P6	0,7	14	51,8	11	1,3
P10bis	3,1	6	86,4	10	3,6
P4	3,0	7	92,0	9	3,3
P3	8,2	4	101,4	8	8,1
P15bis	2,5	9	118,6	7	2,1
P17	2,0	10	120,6	6	1,6
P2	2,8	8	136,2	5	2,0
P11	6,9	5	149,3	4	4,6
P9	9,9	3	303,4	3	3,2
P18	34,7	1	356,2	2	9,7
P7	11,3	2	446,1	1	2,5
Blanc protocole	N.D		N.D		N.D

### 3. Comparaison des empreintes chromatographiques des sols du site

Les extraits de sol ont également été analysés par GC-MS en mode balayage afin de comparer leurs profils chromatographiques. Les chromatogrammes ont été comparés et superposés afin d'identifier des différences possibles de profils. Au niveau du signal, les sols P9, P20, P6 et P7 ont montré des intensités de signal équivalentes avec comme pics majoritaires ceux du fluoranthène, du pyrène et du phénanthrène (sauf pour le P7 où la concentration en phénanthrène est plus faible). Pour les sols P9 et P20, malgré une extraction sur 0,1g de sol sec et une injection de 1 µl d'extrait, une saturation du signal pour le fluoranthène et le pyrène

est observable. Ces composés sont les principaux constituants de la créosote ce qui explique la prédominance du signal associé à ces composés. En réalisant une étude comparative des chromatogrammes, seule l'intensité des pics chromatographiques varie mais aucune différence qualitative n'est observable (présence d'un pic dans un chromatogramme mais absent sur un autre). Il en est de même pour l'ensemble des autres sols qui présentent des signaux avec une abondance plus faible mais également aucune différence observable au niveau qualitatif que ce soit avec les autres sols présentant une intensité de signal plus importante ou équivalente.

#### ***4. Conclusion sur le criblage du site et sélection du sol à fractionner***

Le criblage chimique et biologique des sols a montré que les sols du site sont principalement contaminés par des composés aromatiques polycycliques (PAC) entraînant une réponse pour l'activité AhR. L'étude des chromatogrammes montre des différences quantitatives et non qualitatives qui semblent être à l'origine des différents niveaux de réponses biologiques observés. Cependant, l'analyse des HAP seule n'explique pas l'activité des sols qui est due à d'autres composés. Afin de simplifier la démarche EDA et limiter les analyses, un seul sol a été utilisé pour l'approche. Le sol sélectionné est le sol P9 car il présente un niveau de contamination élevé en HAP et une activité AhR importante (TEQ-bio = 303,4 µg EQ TCDD/g de sol). De plus les 16 HAP de la liste US-EPA n'expliquent que 3,2% de l'activité observée pour ce sol. Du fait de sa forte contamination, le sol P9 a été choisi pour la démarche EDA.

## II. Criblage des sols du site de traitement de gaz pour sélectionner le sol le plus pertinent à fractionner et pour une analyse chimique plus poussée.

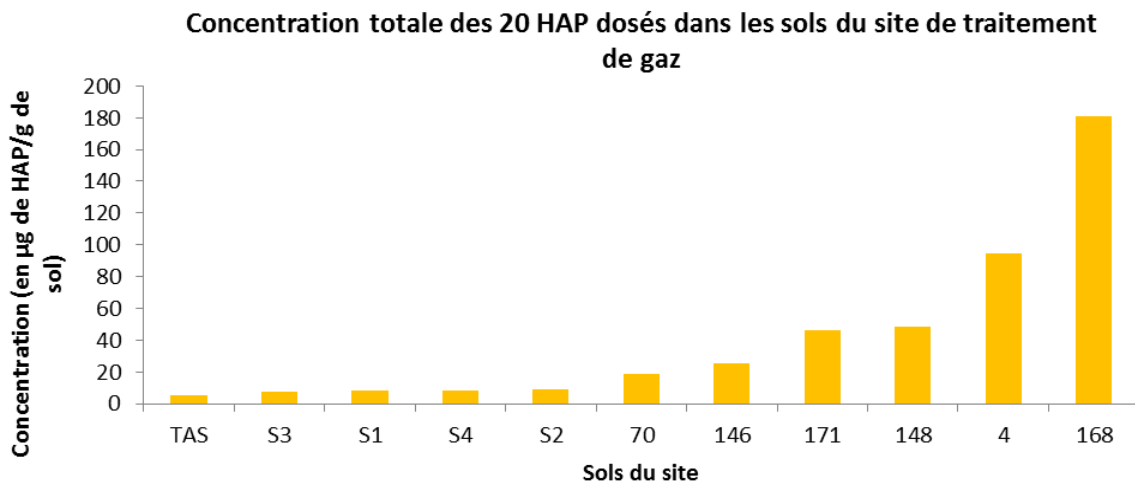
Tout comme le premier site d'étude, les sols de l'usine de traitement de gaz ont fait l'objet d'un criblage afin de sélectionner le ou les sols les plus pertinents à étudier avec une démarche EDA.

### 1. Les analyses ciblées

Les analyses ciblées ont mis en évidence la présence de HAP et de PCB dans les sols du site étudié.

#### 1.1. Analyse des HAP

L'analyse des HAP a pu mettre en évidence la présence des HAP présentés Tableau 38. En comparant la somme des HAP, il est possible de faire un distinguo entre les sols originaires du milieu naturel qui présentent des concentrations en HAP inférieures à 10 µg de HAP/g de sol sec et les sols de l'usine dont les concentrations sont supérieures à 18 µg de HAP/g de sol sec. Selon la réglementation, un sol excavé est considéré comme contaminé si sa concentration en HAP dépasse les 50 µg/g de poids sec (Ordre du 12 Décembre 2014, Journal officiel de la République française). Les sols 70, 146, 171 et 148 présentent tous des concentrations inférieures à ce seuil, ils peuvent donc être considérés comme non contaminés selon la réglementation française sur les déchets inertes. Seuls les sols 4 et 168 présentent des teneurs élevées en HAP avec des concentrations de 94,2 et 180,6 µg/g respectivement. Il est à noter que le niveau de contamination en HAP de ce site est nettement inférieur à celui du site contaminé par la créosote.



**Figure 54** : Concentration totale sur les 20 HAP dosés des différents sols échantillonnés dans l'usine de traitement de gaz. TAS : sol témoin. S1-S3 : sol se situant en dehors de l'usine dans le milieu naturelle entourant le site. Les autres sols correspondent à des sols échantillonnés sur le site d'étude.

**Tableau 38** : Concentration (en  $\mu\text{g/g}$  de sol) des différents HAP dosés dans les sols de l'usine de traitement de gaz. Les LQ (limite de quantification) sont indiquées en picogrammes injectés.

	LQ	TAS	S1	S2	S3	S4	4	70	146	148	168	171
Naphtalène	0,54	0,04	0,61	0,36	0,40	0,48	0,43	0,05	0,11	0,20	1,30	0,25
Phénanthrène	0,74	0,15	1,43	1,23	1,23	1,16	5,96	0,83	1,76	3,19	12,27	3,50
Anthracène	1,14	0,04	0,33	0,25	0,24	0,28	1,86	0,21	0,51	0,98	4,21	1,11
Acénaphtylène	1,00	0,01	0,13	0,08	0,07	0,19	0,03	0,03	0,02	0,03	0,07	0,02
Acénaphthène	1,42	0,04	0,08	0,07	0,08	0,07	0,87	0,06	0,26	0,49	1,78	0,47
Fluorène	0,68	0,03	0,11	0,12	0,12	0,15	0,67	0,07	0,19	0,33	1,69	0,41
Fluoranthène	0,61	2,74	0,59	0,81	0,63	0,59	9,74	1,32	2,90	5,30	18,54	5,08
Pyrène	0,68	1,39	0,78	0,89	0,73	0,79	8,70	1,23	2,57	4,84	16,21	4,54
Benzo(a)anthracène <sup>b</sup>	0,90	0,08	0,34	0,50	0,34	0,40	7,75	0,95	2,10	3,81	14,36	3,82
Chrysène <sup>b</sup>	0,63	0,15	0,58	0,84	0,68	0,59	8,20	1,16	2,33	4,27	15,52	4,16
2,1-Benzonapthothiophene	0,25	0,02	0,30	0,28	0,23	0,22	0,98	0,12	0,13	0,54	3,62	0,73
BbF+BfF+BkF <sup>b</sup>	1,55	0,20	0,67	1,05	0,81	0,83	14,84	1,94	4,08	7,59	27,66	6,93
Benzo(e)pyrène	1,22	0,10	0,39	0,59	0,48	0,47	6,48	0,86	1,72	3,33	12,08	3,08
Benzo(a)pyrène <sup>b</sup>	2,44	0,09	0,33	0,50	0,33	0,56	9,12	1,10	2,46	4,94	16,90	4,31
Perylène	3,41	0,02	0,06	0,11	0,07	0,12	2,86	0,19	0,56	1,20	5,05	0,94
Indeno(1,2,3-cd)pyrène <sup>b</sup>	3,41	0,06	0,23	0,42	0,29	0,40	6,82	7,36	1,58	3,30	12,80	2,86
Dibenzo(ah)anthracène <sup>b</sup>	1,55	0,01	0,11	0,11	0,08	0,07	1,83	0,12	0,36	0,73	3,53	0,68
Benzo(g,h,i)perylène	3,41	0,08	0,33	0,45	0,32	0,52	6,47	0,75	1,61	3,42	11,99	2,83
Dibenzothiophène	0,21	0,02	0,65	0,52	0,52	0,50	0,63	0,06	0,16	0,22	0,98	0,21
$\Sigma$ HAP		<b>5,2</b>	<b>8,0</b>	<b>9,2</b>	<b>7,6</b>	<b>8,4</b>	<b>94,2</b>	<b>18,4</b>	<b>25,4</b>	<b>48,7</b>	<b>180,6</b>	<b>46,0</b>

## 1.2. Analyse des PCB

L'analyse des PCB des différents sols de l'usine de traitement de gaz permet d'observer que trois sols présentent une concentration importante et dont la somme dépasse les  $1 \mu\text{g/g}$  de sol, valeur seuil où un sol est considéré comme pollué dans la réglementation (Arrêté du 12 Décembre 2014) (Tableau 39). Les trois sols dépassant le seuil sont les sols S3, 70 et 168.

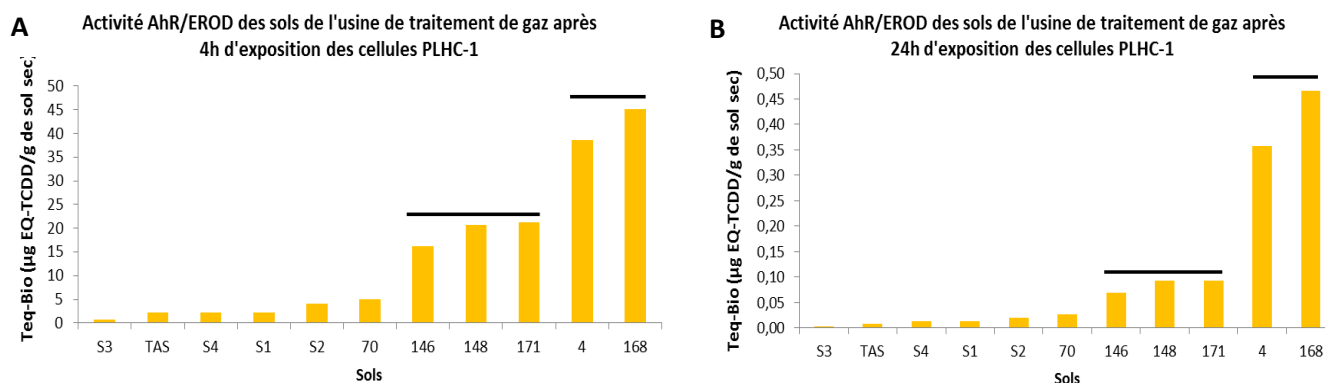
Les PCB les plus représentés sont les suivants : PCB 101, PCB 138, PCB 153, PCB 170, PCB 180 et le PCB 187.

**Tableau 39** : Concentrations (en ng/g de sol sec) des différents PCB dosés dans les sols de l'usine de traitement de gaz. Les LQ (limite de quantification) sont indiquées en picogrammes injectés.

	LQ (pg injecté)	TAS	S1	S3	S2	S4	4	70	146	148	168	171
CB 8	0.46	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
CB 18	0.32	<LQ	25	<LQ	5	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	9	<LQ
CB 29	0.18	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
CB 28	0.19	<LQ	3	3	3	4	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	6	<LQ
CB 50	0.20	4	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
CB 52	0.22	<LQ	13	178	15	17	2	14	<LQ	2	39	3
CB 104	0,19	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
CB 44	0,17	2	6	48	6	5	<LQ	4	<LQ	<LQ	14	<LQ
CB 66	0,19	<LQ	<LQ	36	5	<LQ	1	47	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
CB 101	0,16	5	8	496	16	8	1	78	1	2	173	2
CB 87	0.13	2	3	243	<LQ	<LQ	<LQ	14	<LQ	<LQ	42	<LQ
CB 77	0.38	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	3	106	3	4	<LQ	5
CB 118	0.19	6	<LQ	456	13	8	<LQ	20	<LQ	1	63	<LQ
CB 188	0.17	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
CB 153	0.16	14	25	375	45	45	2	355	3	7	520	6
CB 105	0.16	2	15	212	5	2	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	22	<LQ
CB 138	0.13	12	50	566	41	41	2	274	3	6	447	5
CB 126	0.12	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	24	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
CB 187	0,28	5	20	48	14	17	1	115	1	3	169	2
CB 128	0,13	2	10	148	6	7	<LQ	19	<LQ	1	38	1
CB 201	0,11	<LQ	2	<LQ	2	<LQ	2	6	<LQ	<LQ	3	<LQ
CB 180	0,13	8	49	97	31	38	<LQ	288	2	6	459	4
CB 170	0,11	6	29	73	18	24	1	136	1	4	223	2
CB 195	0,10	1	5	7	3	3	<LQ	18	<LQ	1	36	<LQ
CB 206	0,10	1	4	<LQ	2	2	<LQ	7	<LQ	<LQ	15	<LQ
CB 209	0,10	<LQ	4	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
ΣPCB	0,12	68	269	2987	227	221	17	1525	16	36	2278	28

## 2. Analyse biologique des sols

Pour ce site également, une réponse biologique n'a été observée que pour l'activité AhR. Les résultats sont présentés Figure 55. Comme montré dans cette Figure, une activité AhR est observable aussi bien à 4h qu'à 24h avec une activité 1000 fois moins importante à 24h impliquant une métabolisation des composés à l'origine de l'activité biologique observée. La réponse des sols montre une activité très faible pour les sols issus du milieu naturel et le sol 70 avec des TEQ-bio inférieures à 5 µg EQ-TCDD/g de sol après une exposition de 4h aux cellules. Les sols 146, 148 et 171 ont une réponse biologique équivalente avec des valeurs de TEQ-bio comprises entre 16 et 22 µg EQ-TCDD/g de sol après une exposition de 4h aux cellules. Enfin les deux sols 4 et 168 se démarquent tout comme lors du dosage des HAP avec des TEQ-bio supérieures à 38 µg EQ-TCDD/g de sol après une exposition de 4h des cellules.



**Figure 55** : Activité AhR des différents sols du site de créosotage après 4h (A) et 24h (B) d'exposition. n=1

L'activité AhR due aux composés chlorés comme la 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxine (TCDD) ou le PCB 126 ne doit pas décliner entre 4h et 24h d'exposition des cellules du fait de l'activation de la réponse cellulaire par ces molécules mais de leur non-métabolisation par le cytochrome P450 1A1 (Aït-Aïssa et Creusot, 2010). En effet, l'activité de la TCDD est de  $1,07E^{-10}$  et de  $9,87E^{-11}$  molaire après 4h et 24h d'exposition des cellules PLHC-1 respectivement (Louiz et al., 2007). Or l'activité biologique des sols diminue d'un facteur 100 entre la lecture à 4h et celle à 24h. Ce type de diminution de l'activité des HAP entre ces deux temps d'exposition est caractéristique des HAP (Aït-Aïssa et Creusot, 2010) impliquant une non-activité ou une très faible activité AhR des PCB détectés dans les sols. L'activité AhR-EROD induite par les PCB n'est pas observable du fait que les principaux PCB présents (PCB 101, PCB 138, PCB 153, PCB 170, PCB 180 et le PCB 187) sont non-inducteurs de la réponse AhR (Della Torre et al., 2013). Pour les PCB inducteurs présents, ils sont des inducteurs avec des TEF faibles (Tableau 40) et sont présents à des concentrations plus faibles que les HAP. Pour étudier ces composés en EDA, il faudrait extraire ces composés sur une plus grande quantité de sol et réaliser une purification par traitement avec de l'acide concentré comme cela a déjà été le cas dans l'étude réalisée par Aït-Aïssa et Creusot (2010) pour observer l'activité de ces composés.

Cependant les PCB sont des composés peu dégradables du fait de leur stabilité chimique et physique (ORS, 2008). Ces molécules sont connues pour leur toxicité et étudiés depuis de nombreuses années. De plus, ils sont facilement analysables en GC-ECD. Leur identification grâce à un processus d'analyse dirigée par l'effet n'est donc pas nécessaire.

**Tableau 40** : Toxic equivalent factor (TEF ou REP) fournis en 2005 par l'organisation mondiale de la santé de 4 PCB présents dans les sols étudiés. Source : Van den Berg et al., 2006

Composé	WHO 2005 TEF Values (based on 2,3,7,8-TCDD)
<b>3,3',4,4'-tetraCB (PCB 77)</b>	0.0001
<b>3,3',4,4',5-pentaCB (PCB 126)</b>	0.1
<b>2,3,3',4,4'-pentaCB (PCB 105)</b>	0.00003
<b>2,3',4,4',5-pentaCB (PCB 118)</b>	0.00003

En appliquant une étude de l'équilibre des masses, la part d'activité AhR imputable aux 16-HAP de la liste US-EPA reste faible pour l'ensemble des sols (Tableau 41). Tout comme pour le site contaminé par la créosote, la mise en place d'une analyse dirigée par l'effet est pertinente.

**Tableau 41** : Activité biologique théorique (Teq-chim) due aux 16 HAP de la liste US-EPA et expérimentaux (TEQ-bio) des sols de l'usine de traitement de gaz. L'activité biologique théorique a été déterminée grâce aux facteurs d'équivalent toxique (TEF) de Louiz et al. (2008) impliquant la 2,3,7,8-TCDD comme molécule de référence. N.D : Non déterminé.

Echantillons	TEQ-bio ( $\mu\text{g EQ TCDD/g}$ de sol)	TEQ-chim ( $\mu\text{g EQ TCDD/g}$ de sol)	Pourcentage expliqué (en %)
Blanc protocole	N.D	N.D	N.D
TAS	2,15	0,02	1
S1	2,25	0,08	4
S2	4,12	0,12	3
S3	0,65	0,09	13
S4	2,21	0,10	4
4	38,54	1,75	5
70	5,04	0,39	8
146	16,23	0,46	3
148	20,70	0,88	4
168	45,20	3,28	7
171	21,17	0,80	4

### 3. Comparaison des empreintes chromatographiques des sols du site

Seuls les sols de l'usine ont été analysés par GC-MS en mode balayage. L'ensemble des sols de l'usine de traitement de gaz montrent des profils identiques mais avec des abondances différentes. Comme pour l'ensemble des autres analyses, les sols 168 et 4 ont une intensité de signal plus importante avec des pics chromatographiques plus intenses.

### 4. Conclusion sur le criblage du site et sélection du sol à fractionner

Le criblage réalisé sur les sols de l'usine de traitement de gaz a mis en évidence la présence de PCB et de HAP. L'ensemble des sols montre un profil de contamination similaire avec deux sols dont le niveau de contamination est plus élevé : Le sol 4 et le sol 168. Le sol 168 a été choisi pour une analyse dirigée par les effets du fait de son niveau de contamination et de sa réponse face à l'ensemble des analyses qu'elles soient chimiques ou biologiques.



**III. Mise en œuvre de l'EDA : Etape 2, application de l'EDA aux sols sélectionnés lors des criblages des sites et à la boue de station d'épuration**

## 1. **Article 1 : Application de l'analyse dirigée par l'effet pour identifier des polluants organiques dans les sols industriels pollués par de la créosote**

**Synthèse de l'article 1** : Les résultats de cette étude confirme que l'application de l'analyse dirigée par l'effet associant un fractionnement par HPLC, la mesure de l'activité AhR et les analyses par GC-Q/ToF fonctionne et permet l'identification de molécules biologiquement actives dans les sols contaminés par un mélange complexe. Le fractionnement a permis de séparer l'activité AhR dans plusieurs fractions sur les 20 que compose le fractionnement. Bien que les HAP soient les principaux constituants de la créosote, ils ne sont responsables que d'une minorité de l'activité AhR observée. Les résultats de l'étude ont permis d'identifier 21 ligands du récepteur Ah connus et inconnus présents dans le sol contaminé. Les molécules responsables de l'activité AhR sont des HAP, mais aussi leurs produits d'oxydation (Oxy-HAP) et des CAP composés de N,O,S-hétérocycles. Actuellement, les Oxy-PAH et N, O, S-hétérocycles ne sont pas pris en compte dans l'évaluation des risques environnementaux alors que la toxicité de certains d'entre eux a déjà été mise en évidence dans plusieurs études. Certains Oxy-HAP (par exemple: le 9H-fluorène-9-one et le cyclopenta(def)phénanthrène) ont une activité AhR alors que leurs HAP parents sont inactifs, soulevant des questions du risque lié à la dégradation des HAP dans le sol par des procédés biologiques ou chimiques. Il en est de même pour les quinoléines, tels que la benzo(f)quinoléine et la benzo(h)quinoléine ayant la même structure que le phénanthrène et ayant une activité biologique contrairement à ce dernier. En outre, ces molécules ont une polarité plus élevée comparée à celles des HAP ce qui les rend plus solubles dans l'eau et leur permet de migrer plus aisément dans d'autres compartiments de l'environnement tel que le milieu aquatique.

## Article: Application of effect-directed analysis to identify organic pollutants in industrial soil polluted by creosote

---

*Status: to submit*

Maximilien DELAFOULHOUZE<sup>1,2</sup>, Karyn LE MENACH<sup>1</sup>, Marie-Hélène DEVIER<sup>1</sup>, Emmanuel GENESTE<sup>1</sup>, Jean-François LASCOURREGES<sup>2</sup>, Sélim AÏT-AISSA<sup>3</sup>, and Hélène BUDZINSKI<sup>1\*</sup>

1. Université de Bordeaux, UMR EPOC 5805 CNRS, LPTC, 351 cours de la Libération, 33405 Talence Cedex, France

2. Fondation Partenariale Innovasol, 1 allée F. Daguin - 33607 Pessac Cedex France

3. INERIS Parc technologique ALATA, 60550 Verneuil-en-Halatte France

\* Corresponding author. Tel.: +33 5 40 00 69 98

E-mail address: h.budzinski@epoc.u-bordeaux1.fr (H. Budzinski).

*Keywords: Effect-directed analysis (EDA), Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), Creosote, Aryl hydrocarbon receptor (AhR), industrial soil*

### Abstract

---

Industrial soils are contaminated by complex organic mixtures while environmental diagnostics only focus on short molecules lists without taking account the complexity of contamination. Creosote is a complex mixture mainly constituted by PAHs causing contamination of many soils in Europe. In order to identify which molecules were be able to cause biological effects in soils contaminated by this mixture, an effect-directed analysis (EDA) was performed in this study. After performing fractionation by high performance liquid chromatography (HPLC) in normal phase and the measurement of the AhR activity on soil extract fractionation. Active fractions were analyzed by gas-chromatography coupled to quadrupole-time of flight mass spectrometry (GC-QTOF-MS) to identified compounds responsible for the biological activity. Although PAHs are the main compounds of creosote, they were responsible for only a minority of AhR activity. Among the active compounds, PAHs (2-Phenylnaphthalene, 11H-benzo(b)fluorene and 11H-benzo(a)fluorene) , Oxy-PAHs (9-fluorenone, cyclopenta(def)phenanthrenone, 11 am-benzo(a)fluorene-11-one, 1,2-Benzo(a)anthraquinone and 5,12-Naphthacenequinone) but also N-,O-,S-heterocyclics (thiophenes, furans, quinolines and carbazoles) were identified. Finally, 41 ± 6% of the AhR activity were explained by the identified molecules. Some Oxy-PAHs exhibited AhR activity while parent compounds were inactive. Some quinolines such as benzo(h)quinoline and Benzo(f)quinoline induced AhR activity while phenanthrene, their analogue PAH was not active. Oxy-PAHs and quinolines are more polar compounds that PAHs and can more easily migrate into others media. These results also raise the issue of PAHs degradation in soil either through biological or chemical processes and possible changes in the toxicity profile of contaminated soils. Finally, this study allowed the identification of new contaminants in industrial sols which could be incorporated in the environmental risk assessment related to the contamination of soil by complex organic mixtures such as creosote.

## **i. Introduction**

---

In industrialized countries, the past and present industrial activities are potentially soil contamination sources. The European Environment Agency estimates that over 2.5 millions of potentially contaminated sites exist across Europe although only 1.2 million of them have already been identified (Panagos et al., 2013). The major pollutants in these contaminated soils are : metals and metalloids (35%), hydrocarbons (24%), chlorinated hydrocarbons (8%), polycyclic aromatic hydrocarbons (10%) and others (11%) (Van Liedekerke et al., 2014).

Generally, soils from industrial sites are contaminated by complex mixtures. However, the current soil quality assessment approach is focused only on priority pollutants without taking into account potentially toxic unanalyzed pollutants. Another way to assess soil quality is the use of bioassays but this kind of analysis don't allow the identification contaminants responsible for toxic effects. A relatively new approach is effect-directed analysis (EDA) which combines chemical analysis with physicochemical fractionation and biotesting. (Brack, 2003).

EDA is often used for the identification of contaminants in waters and sediments (Marvin et al., 1994, 1999, 2000; Reineke et al., 2002 ; Grung et al., 2007; Kaisarevic et al. 2009 ; Schulze et al. 2010; Wölz et al. 2010; Schmitt et al. 2011; Regueiro et al. 2013; Fetter et al. 2014 ; Liscio et al. 2014) and more specifically for the identification of endocrine disruptors (Houtman et al., 2006; Oh et al., 2009 ; Creusot et al., 2014 ; Simon et al., 2015). However, few studies were dedicated to the identification of toxic compounds in soil using EDA. Legler et al. (2011) applied an EDA approach to a soil of a former municipal landfill. Their study allowed to identify new toxic compounds for the development of the zebrafish such as 11H-benzo[b]fluorene, 9-methylacridine, 4-and 2-azapyrene phenylquinoline, molecules which are currently not included in the environmental diagnostics of soils. A second study was conducted by Wincent et al., (2015) on a gas plant, a former wood preserving site and a coke oven site. The extracts and fractions were tested for their Aryl hydrocarbon (Ah) activity and developmental toxicity on zebrafish. All the fractions were shown to induce the production of Ah receptor-regulated mRNA, deformities and increased mortality of fish. This study demonstrated that the oxy-PAHs as PAHs are able to induce an AhR activity and a developmental toxicity. These two studies evidenced the usefulness of EDA approach for the identification of toxic compounds in complex mixtures such as industrial contaminated soils.

Coal tar creosote is a mixture which has been used for protecting exterior wood as railroad or telephone poles. It contains approximately 10 000 compounds even if PAHs compose approximately 80% of this mixture (Sundström et al., 1986). Coal tar creosote is a good exemple of complex contamination of industrial soils. Underground waters contaminated by creosote were also study thanks to EDA where it showed that N-heterocycles, phenolics and substituted PAHs were more toxic than the unsubstituted ones using the Microtox© assay (Hartnik et al., 2007). The difficulty by using Microtox© as bioessay in EDA is the non-specific mechanisms of toxic action and the contribution of all chemicals to the non-specific toxic burden according to their (Brack et al., 2016). The aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a transcription factor (such as basic helix-loop-helix) activated by a ligand involved in the regulation of biological planar aromatic hydrocarbons responses such as dioxins, furans and PAHs (Whyte and Tillitt. 2001). It regulates the xenobiotic metabolizing enzymes, such as cytochrome P450 (Hahn, 2002). This receptor induce the production of cytochrome P450 1A1 of which 7-ethoxyresorufin o-deethylase (EROD) activity is easily analyzed in laboratory. Bioassays involving this receptor are used to identify the observed molecules responsible for this activity (Sanderson et al., 1996; Bols et al., 1999 ; Wölz et al., 2010; Brack and Schirmer, 2003; Blankenship et al., 2003)

The purpose of this study is to apply an EDA to identify the pollutants responsible of AhR activity on a industrial plant soil of wood impregnation by creosote to identify new interest contaminants in contaminated soil that could be incorporated in chemical diagnostics of these soils.

## ii. Materials and methods

---

### 3.1. Chemicals and reagents

All solvents used were at least of HPLC grade quality and were purchased from Atlantic Labo (Bruges, France). All the compound standards and the deuterated surrogate standards (>98% purity) were obtained from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France), from CIL Cluzeau (Sainte-Foy-La-Grande, France) and from Chiron, provided by BCP Instruments (Oullins, France).

Dimethylsulfoxid (DMSO) (biological reagent grade quality) was provided by Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France). All biological reagents for cell culture and bioassays were provided by Fisher Scientific (Illkirch, France). Ligands of AhR were purchased from Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France). Azote and helium were provided by Linde (France).

### 3.2. Site description and sampling

The study site was an industrial plant of railroad creosote wood impregnation located in the South of France. Soils were sampled in Juin 2012 using a shovel and directly sieved at 4 mm. After three days of air drying, they were then sieved at 2 mm. They were kept at room temperature in amber jars until analysis. 20 soils were sampled following a sampling plan was developed by the foundation Innovasol after a literature review (interpretation of the state of media - BG Report, January 2010) and a preparatory site visit. After a chemical analysis on PAH, the measurement of AhR activity of each soil and a comparison of the chromatographic fingerprints, one of them was kept for effect directed analysis due to its level of PAH contamination, its AhR activity and and the lack of AhR activity explained by a mass balance approach.

### 3.3. Soil extraction by pressurized liquid extraction (PLE)

0,1g dried (dw) soil sample was extracted in duplicate by PLE (ASE 200, Dionex Voisins le Bretonneux, France). Briefly, the soil was placed in 11 mL stainless steel extraction cells and the dead volume filled with previously cleaned glass beads. For blank protocole, the extraction was done only on beads without matrix. Extraction was performed with a mixture of methanol (MeOH)/dichloromethane (DCM) (1/1, v:v) at a temperature of 75°C and a pressure of 100 bars. Four cycles of static extraction were done for 5 min and extraction cell was purged for 60s with nitrogen. The 25 mL extract volume were concentrated under a stream of nitrogen, resulting in a final volume of 1.8 mL in MeOH/DCM (1/1; v:v) for storage and kept at -20°C until fractionation.

### 3.4. Fractionation by normal phase-HPLC (NP-HPLC)

300 µL of soil extract were redissolved in n-hexane after evaporation to dryness (100%) and 250 µL were fractionated by NP-HPLC. The 50 µL remaining of the remainder of the supernatant hexane was evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen and reconstituted in DMSO for *in vitro* bioassay to test its AhR activity before fractionation. The HPLC system was composed of a quaternary pump (Agilent Technologies P1200), a diode array detection system (Agilent Technologies P1200) operated from 190 nm to 400 nm, an autosampler (Agilent Technology P1200), a column thermostat (Agilent Technologies P1200) and an automatic fraction collector (Agilent Technologies infinity 1260), and equipped with a NH<sub>2</sub> column (Microsorb NH<sub>2</sub> 100- 5, 4,6 x 250 mm, Varian®) (Agilent technologies, Les Ulis, France) was used. Fractionation was performed at a flow rate of 1 mL/min using n-pentane, DCM and acetonitrile as mobile phase under the following gradient conditions: initial condition of 100% pentane for 7 min, followed by a linear gradient to 100% DCM within 10 min and held 5 min and then by a linear gradient to 100% acetonitrile within 4 min, held for 4 min, followed by a re-equilibration time to the initial conditions (run time of X min). The fractions were collected every 2 min from 0 to 40 min, resulting in 20 HPLC fractions. The fractions were dried under a gentle stream of nitrogen and redissolved in 250 µL DCM. For the EROD assay, a 100 µL aliquot was dried and redissolved in 100 µL DMSO. 50 µL of each fraction were pooled, also dried and redissolved in 50 µL DMSO to compare the activity of the pooled fractions to those of the raw PLE extract and the supernatant extract. The rest of each fraction (100µL) was kept in DCM for

analysis by gas-chromatography coupled to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (GC-QTOF-MS). Before each fractionation a standard solution of 16 standards with LogP between 3,17 and 11,24 were injected to check the quality of experiment and any changing in retention times.

### 3.5. 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) assay in using PLHC-1 cell line and cell viability

The PLHC-1 cell line (ATCC , CRL-2406), derived from topminnow (*Poeciliopsis Lucida*) hepatocellular carcinoma, was routinely cultured in Eagle's Essential Medium (MEM) supplemented with 10% foetal bovine serum, 1 mM sodium pyruvate, 1 mM non-essential amino acids, 50 U/mL penicillin G and 50 µg/mL streptomycin, under controlled atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 30°C. When 90% of confluence was reached, cells were dissociated with 0.05% (w/v) trypsin EDTA for subculturing and experiments. For experiments, cells were seeded in 96-well plates (TPP®, Dominique Dutcher SAS, Brumath, France) at 5.10<sup>4</sup> cells/well (100 µL) and allowed to grow for 24h. On test day, cells were exposed in triplicate to serial dilutions of BaP (reference ligand), soil extract or fractions for 4h (PAH-like activity) before reading by a spectrofluorimeter (Synergy 2 Biotek®, Colmar, France) during 10 min and using the 530/590 wavelength. In parallel, cellular viability was tested for different concentrations of soil extract by using the methyl-thiazol-tetrazolium (MTT) assay, as previously described by Laville et al. (2004).

### 3.6. AhR activity analysis, calculation of bio-TEQ, chem-TEQ and use of mass balance analysis.

Dose-response curves were modelled by using the Regtox 7.5 Microsoft Excel™ macro (Vindimian et al., 1983). This macro uses the Hill equation model and allows calculation of EC20 (concentrations of test chemical or soil extract that induce 20% of maximal response). Bioassay-derived BaP- (BaP-EQ) were determined by dividing the EC20 of the reference chemical (BaP expressed in g/L) by that of the soil extract or its HPLC fractions (expressed as equivalent gram of dry soil per litre).

Activity contribution of compounds (Chem-TEQ) was determined using the chemical concentrations in soil (C<sub>i</sub>) and the relative equivalent potency of tested chemical (REPi) obtained by ratio of EC20 of Benzo(a)pyrene (the reference compound) on EC20 of tested compound (Louiz et al., 2008). Chem-TEQ is the result of the following equation : chem-TEQ = Σ (C<sub>i</sub> × REPi). Finally, Chem-TEQ was compared to the toxic-equivalent derived from bioassays activities (Bio-TEQ) which is the ratio of the EC20 of Benzo(a)pyrene (the reference chemicals, in g/L) to that of the sample (or fraction) expressed as equivalent gram per liter (g EQ/L).

### 3.7. Target analysis of priority PAHs in the selected soil sample

The selected soil was extracted by PLE with the following parameters. Extraction was performed with dichloromethane at a temperature of 100°C and a pressure of 100 bars. Two cycles of static extraction were done for 8 min and extraction cell was purged for 60s with nitrogen. Then PAH were purified on alumina and silica microcolumns as previously describe by Guillon et al., (2013). Analysis of soil crude extract (in triplicate) was carried out on the 16 US-EPA PAHs, benzo[e]pyrene and dibenzothiophene (Table 1) by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) (Agilent Technologies 6890 GC and 5973 MS, Waghäusel, Germany) (Guillon et al., 2013). Activity contribution of PAHs (Chem-TEQ) was also determined by using the REPi (Louiz et al., 2008).

### 3.8. Analysis of active fractions by GC-QTOF-MS

Analyses of active HPLC fractions were performed with an Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) GC-QTOF-MS system consisting of a 7890B GC connected to a 7200 QTOF mass analyzer, equipped with an electronic impact (EI) ionization source. Compounds were separated in a HP-5MS column (5 % Phenyl- 95 % Methyl-siloxane; 30 m x 250 µm x 0,25 µm) (Agilent technologies, Massy, France). 1 µl of positive fractions was injected in pulsed splitless mode at a temperature of 280 °C. The injection rate was 1.3 mL.min<sup>-1</sup> and the carrier gas used is pure helium at 99.9990%. The oven was programmed from 50 °C (2 min) at 2 °C.min<sup>-1</sup> to 325 °C, maintained for 0.5 min (runtime of 145 min).

The QTOF instrument was operated in the extended dynamic range 2 GHz mode with a mass resolution lower than 5 ppm. Compounds were ionized at 70 eV. Source and quadrupole temperatures were 150°C. The acquisition was performed in single MS mode and scan spectra were recorded in the mass range from 50 to 500 m/z, with each spectrum collected (consisting of 5 transients) every second.

Before each batch analysis, the QTOF instrument was calibrated to ensure the mass accuracy and resolution of detector was not modified. The analytical instrument performances (resolution, mass accuracy, and sensitivity) were also verified using a certified solution of some PAHs analyzed in these soils at 5 ng/g of acetone. If a shift in resolution, mass accuracy or in the sensitivity of the instrument was observed, a maintenance was carried out to find the correct parameters.

The chromatographic data are processed with the Agilent MassHunter Qualitative Analysis Software (B7.0 Agilent Technologies). The treatment is only done manually. Peaks in the chromatogram (TIC: total ion chromatogram) are analyzed individually. Only peaks ten times higher than the background noise were analyzed. After obtaining the mass spectrum of a peak, the background noise is removed using the mass spectrum of TIC baseline. Then the resulting spectrum is compared with the NIST11 mass spectral library. Only compounds with a match factor higher to 20% with the NIST and a mass error lower than 5 ppm were kept.

For candidates, a research on ChemSpider and PubChem database is performed to obtain informations as logP and CAS number and check if it is known to have AhR activity. For possible inducers of AhR activity, the confirmation of their activity is done by buying the standard.

### 3.9. Activity and chemical confirmation of contaminants

For compounds whose standards are commercially available, the confirmation is carried out at three levels by testing standard for its AhR / EROD activity, by injecting HPLC to verify that its elution fraction corresponds to that in which it was identified and by dosing it by the GC/MS. For an active molecule, the REPi was determined as the ratio of EC20 of Benzo(a)pyrene on EC20 of tested compound (Table 4). For active compounds, their concentrations in the fractions were determined through targeted analysis by GC-MS using external calibration and the same parameters than the PAH analysis. The AhR activity part of the compounds in fractions was determined by using Chem-TEQ calculation.

### 3.10. Quality control

In all assays, each sample or compound was tested at various concentrations in triplicate, which always included both negative controls (solvent), positive control (TCDD and BaP) and complete dose response for reference chemical (TCDD for modelisation of dose-response curve and BaP for determining REPi or Bio-TEQ). A blank protocol following each step of any samples was also tested to check no contamination due to the manipulation. Before each experiment, the glassware was washed and pyrolyzed to ensure no cross-contamination takes place.

## iii. Results

---

### 3.1. PAH content and contribution of AhR activity observed

Concentration of total PAH in soil was  $5625 \pm 642$  mg/g dw. The predominant PAHs found in the soil were phenanthrene ( $1220.4 \pm 135.5$  mg/g dw), fluoranthene ( $1912.7 \pm 207.0$  mg/g dw) and pyrene ( $1468.0 \pm 157.2$  mg/g dw) (Table 1). These three PAHs are also the main components of creosote for which they accounted for about 40% in weight (Sundström et al., 1986). In addition the contamination profile is similar to those reported in soils contaminated by old creosoted railway ties (Moret et al., 2007).

Using the mass balance calculation, the activity induced by the quantified PAHs could be determined (see section 2.6). Their contribution to the observed activity is 10% (Table 1). Although PAHs are the main constituents of creosote and constitute 80% of its mass, the priority PAHs contributed to a negligible part of the AhR / EROD activity of the soil extract. Hence, 90% of the activity measured on the crude extract is due to non-target compounds present in the industrial soil.

No decrease in the cell viability was observed with the MTT assay showing no cytotoxic effects of different extract concentrations.

Concentrations of priority PAHs in the soil sample ( $\mu\text{g/g dw}$ ) and REPs		
Compound	Concentration ( $\mu\text{g/g}$ of dry soil)	REP BaP 4h
Naphtalene	$2.5 \pm 0.5$	n.i <sup>(a)</sup>
Phenanthrene	$1220.4 \pm 135.5$	n.i <sup>(a)</sup>
Anthracene	$105.0 \pm 31.9$	n.i <sup>(a)</sup>
Acenaphthylene	$8.4 \pm 6.0$	$5.56\text{E}^{-03(a)}$
Acénaphtene	$186.5 \pm 16.8$	n.i <sup>(a)</sup>
Fluorene	$261..5 \pm 28..0$	n.i <sup>(c)</sup>
Fluoranthene	$1912.7 \pm 207.0$	n.i <sup>(a)</sup>
Pyrene	$1468.0 \pm 157.2$	$3.58\text{E}^{-03(a)}$
Benzo(a)anthracene	$42.4 \pm 6.5$	$2.58\text{E}^{-01(a)}$
Chrysene	$73.3 \pm 9.0$	$2.92\text{E}^{-01(a)}$
BBF and BKF	$64.5 \pm 7.9$	$6.94\text{E}^{-01}$ (BbF) and $2.94$ (BkF) <sup>(a)</sup>
Benzo(e)pyrene	$24.9 \pm 3.0$	n.i
Benzo(a)pyrene	$9.2 \pm 1.5$	1 <sup>(a)</sup>
Indeno(1.2.3-cd)pyrene	$7.8 \pm 1.1$	$8.43\text{E}^{-01(a)}$
Dibenzo(ah)anthracene	$1.7 \pm 0.3$	$3.66^{(a)}$
Benzo(g,h,i)perylene	$7.7 \pm 0.9$	n.i <sup>(a)</sup>
Dibenzothiophene	$202.6 \pm 21.9$	n.i
$\Sigma\text{HAP}$	$5625.4 \pm 642.4$	
Percentage of AhR activity explained by the measured PAHs (%)		
TEQ-Chim ( $\mu\text{g EQ-BaP/g}$ of dry soil)		$177 \pm 23$
TEQ-Bio ( $\mu\text{g EQ-BaP/g}$ of dry soil)		$1688 \pm 140$
% of AhR activity explained		$10 \pm 1$

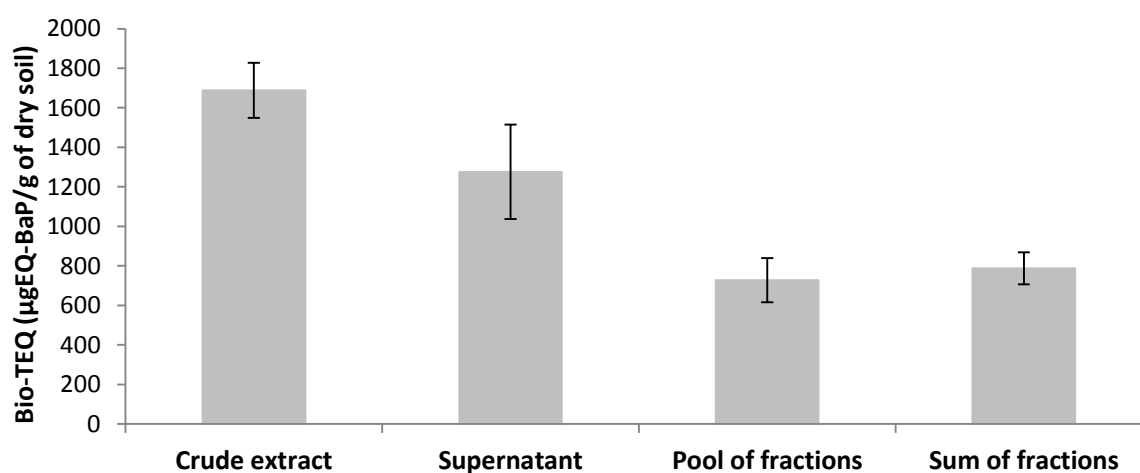
**Table 1** : PAH content of the analysed soil ( $\mu\text{g/g}$ ) and the REPs of Acenaphthylene, Pyrene, Benzo(a)anthracene, Chrysene, Benzo(b)fluoranthene, Benzo(k)fluoranthene, Benzo(a)pyrene, Indeno(1.2.3-cd)pyrene et Dibenzo(ah)anthracene. and comparison between the experimental AhR-activity (Bio-TEQ) and the theoretical activity based on additif effects (Chem-TEQ). n.i : non inductor of AhR activity in the range of tested concentrations ( $2 \mu\text{g/L}$  to  $2 \text{mg/l}$ ). (a) : compound tested for its AhR in a previous study (Louiz et al., 2008).

### 3.2. Fractionation and AhR activity of fractions

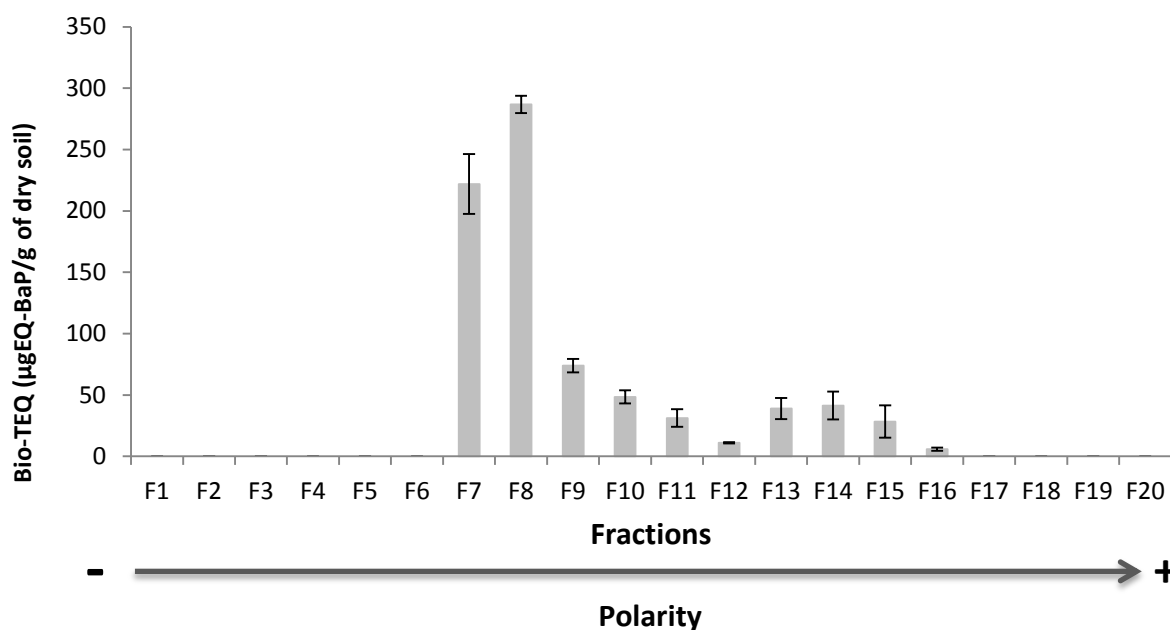
The crude extract was fractionated by NP-HPLC and crude extract and HPLC fractions were tested for AhR activity. The AhR activity of extract at different step of fractionation is presented Figures 1 and the distribution of AhR activity among fractions is presented Figure 2. A decrease of the AhR activity was observed between the crude extract (bio-TEQ =  $1688 \pm 140 \mu\text{g EQ-BaP/g dw}$ ), the supernatant



injected into HPLC (bio-TEQ =  $1275 \pm 239$   $\mu\text{g EQ-BaP/g dw}$ ) and the pool of fractions (bio-TEQ =  $727 \pm 112$   $\mu\text{g EQ-BaP/g dw}$ ), indicating that the sample treatment procedure led to some loss of active compounds. The sum of the AhR activity of the fractions (bio-TEQ =  $787 \pm 82$   $\mu\text{g EQ-BaP/g dw}$ ) is equivalent to the biological activity of the pool of fractions respecting the additive effects model for induction of AhR activity. Figure 2 shows the AhR activity of the different fractions. The biological activity is distributed between fractions 7 and 16 indicating that the process of fractionation by HPLC is efficient to separate active compounds between the different fractions depending of their polarity. By comparing the activity of the fractions with the sum of fractions activities (Figure 1; Bio-TEQ =  $787 \pm 82$   $\mu\text{g EQ-BaP/g dw}$ ), the fractions 7 and 8 ( $509 \pm 31$   $\mu\text{g BaP-EQ/g dw}$ ) contributed to 50% of the soil AhR activity. Fractions 9-16 share the rest of AhR activity. They contained compounds more polar than those present in the fractions 7 and 8, involving a better solubility of these molecules in water.



**Figure 1** : AhR activities of extract for 4h of PLHC-1 exposure after different steps of fractionation. Crude extract : Extract tested for its activity after PLE extraction. Supernatant : Extract tested for its activity after solubilisation in hexane and recovery of supernatant. Pool of fractions : Activity of global extract after fractionation and pool of all fractions. Sum of fractions : sum of fractions activities. Results are expressed as  $\mu\text{gEQ-BaP/g}$  (mean  $\pm$  SD. n = 3).



**Figure 2** : AhR activities of all fractions after 4h of PLHC-1 exposure. Fractions were collected all 2 minutes and the elution follows a gradient from the less polar solvent (n-pentane) to the more polar solvent (acetonitrile).

### 3.3. Chemical composition of the active fractions

Fractions 7 to 15 were then analyzed by GC-QTOF (single MS mode) to identify active compounds. Table 2 presents the identified molecules in the different fractions. Fractions 7 and 8 are composed mainly by the 16 US-EPA PAHs and their alkylated analogues (see Table 2). This elution is consistent with the PAH standards injection in HPLC where they eluate in these fractions. However, these fractions also contain other PAHs, like 7H-benzo[c]fluorene, 11H-Benzo [b] fluorene, the 11H-Benzo [a] fluorene, the 4H-cyclopenta [def] phenanthrene, the Naphthalene, 2-phenyl and 1H-indene, 1-(phenylmethylene) - and S-, O- and N-heterocycle compounds.

Most identified Oxy-PAHs are eluted in fraction 9 where they have the largest signals (see Table 2). The presence of N-Heterocycles and more particularly carbazole (86-74-8) and various forms of alkylated carbazoles is also observed.

All other fractions (F10-F15) are composed essentially of N-heterocycles (see Table 2) and more particularly of quinoline related compounds (eg: Benzo(h)quinoline ;1-Azapyrene).For all PACs having heteroatoms which were dosed in soil, their concentration is in the order of µg/g dw and are in the range of PAH concentrations (Table 1 and 4).

Some compounds are eluted in more than one fraction as cyclopenta (def) phenanthrenone that was found in 7 fractions (Tables 2 and 3).This result is due to a lag effect in the elution of this compound which was also seen during the injection into HPLC of the standard alone. However, the cyclopenta (def) phenanthrenone is an exception and the majority of the compounds are present in one or two fractions.

The compounds with the highest signals and also commercially available were analyzed for their AhR activity. Then, their concentration in fractions where determined in order to estimate their contribution

to the observed AhR activity of the corresponding fraction. Compounds tested are in bold in the table 2. A total of 25 identified molecules were tested for their AhR activity.

#### 3.4. *Characterization of the potential AhR activity of some identified compounds*

Among the compounds tested, six were inactive compounds or are weak inducers (induction of less than 20% relative to the maximum TCDD activity) for AhR activity. These compounds are 4H-cyclopenta(def)phenanthrene (inactive; fraction 7), Anthracene, 9,10-dihydro (inactive fraction 7), the 7H-benzo(c)fluorene (maximal induction of 11%; fractions 7 and 8), 9,10-anthracenedione (inactive fraction 9) and 9,10-Anthracendione, 2-Methyl (inactive fraction 9).

The other 19 compounds have AhR / EROD activity and their REPs have been determined (Table 3). The REPi are between 6.05E-4 and 9.74E-2 (6.05E-4 for the Benzo(h)quinoleine and 9.74E-2 for 11H-Benzo(b)Fluorene. These active compounds were then searched in the corresponding fractions by GC/MS. Their presence was confirmed, indicating that the non-target analytical procedure is effective, and their concentrations determined by external calibration. By achieving a mass balance analysis (MBA) for each fraction, their contribution to the observed biological activities was determined and accounted for 47% in fraction 7 (51% when including those of the priority PAHs), 5% in fraction 8 (65% with priority PAHs) indicating that PAHs usually monitored in environmental studies are responsible for the majority of the fraction biological activity), and 19% in fraction 9. All compounds quantified in fractions F10-15 explained less than 1% of the AhR activity of the corresponding fractions.

Finally, the total TEQ-Chim of all compounds is 421  $\mu\text{g}$  EQ-BaP/g dw. By comparing the sum of the fractions activities which is  $787 \pm 82$   $\mu\text{g}$  EQ-BaP / g dw, the AhR activity explained by all identified compounds (with 16 PAH of the list of the US-EPA included) is  $41 \pm 6\%$ .

**Table 2** : Compounds identified (and their CAS number) in each active fractions by GC/ToF. Compounds in bold have been tested for their AhR activity and if their where actif, their they were dosed by GC/MS

Fraction 7	<p><u>PAH</u> : <i>Naphthalene</i> (202-049-5) and alkylated naphthalene, <i>Fluorene</i> (86-73-7) and alkylated fluorene, <b><i>Anthracene, 9,10-dihydro-</i></b> (613-31-0), <i>Phenanthrene</i> (85-01-8) and alkylated phenanthrenes, <i>Anthracene</i> (120-12-7) and alkylated anthracenes, <i>Anthracene, 9,10-dihydro-2-methyl-</i> (948-67-4), <b><i>4H-Cyclopenta[def]phenanthrene</i></b> (203-64-5), <i>Naphthalene, 2-phenyl-</i> (612-94-2), <i>Pyrene</i> (129-00-0) and alkylated pyrenes, <i>Fluoranthene</i> (206-44-0) and alkylated fluoranthenes, <b><i>7H-Benzo[c]fluorene</i></b> (205-12-9), <b><i>11H-Benzo[b]fluorene</i></b> (243-17-4), <b><i>11H-Benzo[a]fluorene</i></b> (238-84-6), <i>1H-indene, 1-(phenylmethylene)-</i>, <i>4H-Benz[de]anthracene, 5,6-dihydro-</i> (4389-09-7)</p> <p><u>O-Heterocycle(s)</u> : <b><i>Benzo(b)naphtho(1,2-d)furane</i></b> (205-39-0), <b><i>Benzo(b)naphtho(2,1-d)furane</i></b> (239-30-5), <b><i>Benzo(b)naphtho(2,3-d)furane</i></b> (243-42-5), <i>2H-Phenanthro[9,10-b]pyran</i> (217-67-4),</p> <p><u>S-Heterocycle(s)</u> : <i>Dibenzothiophene</i> (132-65-0), <i>Phenaleno[1,9-bc]thiophene</i> (79965-99-4), <b><i>Benzo[b]naphtho[2,1-d]thiophene</i></b> (239-35-0), 5 no-identified compounds</p>
Fraction 8	<p><u>PAH</u> : <i>Acenaphthylene</i> (208-96-8), <i>Phenanthrene</i> (85-01-8) and alkylated phenanthrenes, <i>Anthracene</i> (120-12-7) and alkylated anthracenes, <i>Fluoranthene</i> (206-44-0), <i>Pyrene</i> (129-00-0), <b><i>7H-Benzo[c]fluorene</i></b> (205-12-9), <b><i>11H-Benzo[b]fluorene</i></b> (243-17-4), <b><i>11H-Benzo[a]fluorene</i></b> (238-84-6), <i>Benz[a]anthracene</i> (56-55-3), <i>Chrysene</i> (218-01-9), <i>Benzo(b)fluoranthene</i> (205-99-2), <i>Benzo(k)fluoranthene</i> (207-08-9), <i>Benzo(j)fluoranthene</i> (205-82-3), <i>Benzo(e)pyrene</i> (192-97-2), <i>Benzo(a)pyrene</i> (52-32-8), <i>Perylene</i>(198-55-0), <i>Benzo(ghi)fluoranthene</i> (203-12-3), <i>Indeno[1,2,3-cd]pyrene</i> (193-39-5), <i>Dibenzo(ah)anthracene</i> (53-70-3), <i>Benzo(ghi)perylene</i> (191-24-2), <i>3H,3'H,3''H-Trisindeno[1,2-a:2',1'-c:1'',2''-e]benzene</i> (17509-71-6)</p> <p><u>Oxy-PAH</u> : <b><i>9H-Fluoren-9-one</i></b> (486-25-9), <i>2H-Naphtho[1,8-bc]thiophen-2-one</i> (20760-29-6), <i>Anthrone</i> (90-44-8), <i>2-Fluorencarboxaldehyde</i> (30084-90-3), <i>9H-Fluoren-9-one, 2,3-dimethyl-</i> (4627-17-2), <b><i>Cyclopenta(def)phenanthrenone</i></b> (5737-13-3), <i>9,10-Anthracenedione, 1-methyl-</i> (954-07-4), <i>9,10-Anthracenedione, 2,7-dimethyl-</i> (3286-01-9), <i>6H-Benz[de]anthracen-6-one</i> (80252-14-8), <b><i>7H-Benz[de]anthracen-7-one</i></b> (82-05-3), <b><i>11H-Benzo[a]fluoren-11-one</i></b>(479-79-8),</p> <p><u>O-Heterocycle(s)</u> : <b><i>Benzo(b)naphtho(1,2-d)furane</i></b> (205-39-0),</p> <p><u>N-Heterocycle(s)</u> : <i>Benzo(f)quinoline, 2-methyl-</i> (39258-30-5), <i>Benzo(h)quinoline, 2,4-dimethyl-</i> (605-67-4), <b><i>Benzo[c]acridine</i></b> (225-51-4),</p> <p><u>S-Heterocycle(s)</u> : <b><i>Benzo(b)naphtho(1,2-d)thiophene</i></b> (205-43-6), <b><i>Benzo(b)naphtho(2,3-d)thiophene</i></b> (243-46-9)</p> <p><u>Nitro-PAH</u> : <i>Naphthalene, 1-isocyano-</i> (1984-04-9), <i>1-Naphthalenecarbonitrile</i> (86-53-3), <i>1-Cyano-4-methylnaphthalene</i> (36062-93-8), <i>9H-Fluorene-2-carbonitrile</i> (2523-48-0), <i>9H-Fluorene-9-carbonitrile</i> (1529-40-4), <i>9-Cyanophenanthrene</i> (2510-55-6), <i>9-Anthracenecarbonitrile</i> (1210-12-4), <i>9-(Cyanomethylene)fluorene</i> (4425-74-5)</p> <p>11 no-identified compounds</p>
Fraction 9	<p><u>Oxy-PAH</u> : <b><i>9H-Fluoren-9-one</i></b> (486-25-9), <i>2-Fluorencarboxaldehyde</i> (30084-90-3), <b><i>9,10-Anthracenedione</i></b> (84-65-1), <b><i>Cyclopenta(def)phenanthrenone</i></b> (5737-13-3), <b><i>9,10-Anthracenedione, 2-methyl-</i></b> (84-54-8), <i>6H-Benz[de]anthracen-6-one</i> (80252-14-8), <b><i>7H-Benz(de)anthracen-7-one</i></b> (82-05-3), <b><i>5,12-Naphthacenedione</i></b> (1090-13-7), <b><i>Benz(a)anthracene-7,12-dione</i></b> (2498-66-0),</p> <p><u>N-Heterocycle(s)</u> : <i>Carbazole</i> (86-74-8) and alkylated carbazoles, <i>5(4H)-Thebenidinone</i> (64884-40-8), <i>1H-Dibenzo[e,g]indazole, 1,2-Benzanthracene-10-aldehyde</i> (7505-62-6)</p> <p>5 no-identified compounds</p>
Fraction 10	<p><u>Oxy-PAH</u> : <b><i>Cyclopenta(def)phenanthrenone</i></b> (5737-13-3),</p>

	<p><u>N-Heterocycle(s)</u> : <b>Benzo(h)quinoline (230-27-3)</b>, 9H-Carbazole-9-methanol (2409-36-1), Acridine, 9-methyl- (611-64-3), Carbazole, 9-methyl- (1484-12-4), 4H-Benzo[def]carbazole (203-65-6),  <i>1 no-identified compound</i></p>
Fraction 11	<p><u>Oxy-PAH</u> : <b>Cyclopenta(def)phenanthrene (5737-13-3)</b>, 2,3-Dihydro-1H-phenalen-1-one (518-85-4), Phenalenone (548-39-0), 1H,3H-Benzo[de]isochromen-1-one (518-86-5), Pyreno(4,5-b:9,10-b')bisoxirene, 3b, 4a, 7b, 8a-tetrahydro-(55400-88-9)  <u>N-Heterocycle(s)</u> : Thieno(2,3-b)quinoline (268-97-3), Quinoline, 2-phenyl (612-96-4), Isoquinoline, 1-phenyl (3297-72-1), 5-phenylisoquinoline (24464-35-5), <b>11H-Benzo(a)carbazole (239-01-0)</b>, <b>7H-Benzo(c)carbazole (205-25-4)</b>,  <u>Nitro-PAH</u>: Benz(a)anthracene-7-carbonitrile (7476-08-6)  <i>3 no-identified compounds</i></p>
Fraction 12	<p><u>Oxy-PAH</u> : <b>Cyclopenta(def)phenanthrene (5737-13-3)</b>,  <u>N-Heterocycle(s)</u> : Benzo(c)carbazole (34777-33-8)</p>
Fraction 13	<p><u>Oxy-PAH</u> : <b>Cyclopenta(def)phenanthrene (5737-13-3)</b>,  <u>N-Heterocycle(s)</u> : Acridine (260-94-6), 6-methylphenanthridine (3955-65-5)  <u>Nitro-PAH</u> : anthracene-9-carbonitrile (1210-12-4)</p>
Fraction 14	<p><u>Oxy-PAH</u> : <b>Cyclopenta(def)phenanthrene (5737-13-3)</b>,  <u>N-Heretocycle(s)</u> : 4-Azapyrene (194-03-6), 7-azafluoranthene (206-49-5), <b>Benzo[f]quinoline (85-02-9)</b>  <i>1 no-identified compounds</i></p>
Fraction 15	<p><u>Oxy-PAH</u> : 2-Hydroxyfluorene (2443-58-5)  <u>N-Heretocycle(s)</u> : 1-Azapyrene (313-80-4), 9-(1H-Indol-3-yl)acridine  <i>2 no-identified compounds</i></p>

1. **Table 3** : Identified compounds having a AhR activity with their calculated REPs (see section 3.4. Characterization of the potential AhR activity of some identified compounds), their concentrations in the soil NP-HPLC fractions where they have been identified (in µg/g dw), the theoretical activity (Chem-TEQ), the experimental activity (Bio-TEQ) and the contribution in AhR activity of the associated fraction (with or without 16 PAH of US-EPA list).

Fraction	Compounds	Concentration (µg/g of dry soil)	REP (BaP 4h)	Chem-TEQ (µg EQ-BaP/g of dry soil)	Bio-TEQ (µg EQ-BaP/g of dry soil)	Contribution (%)
7	Naphthalene, 2-phenyl-	385	1.05E-03	104	222±24	47%. 49% with PAHs (TEQ-Chim of PAH found in this fraction equals to 5 µg EQ-BaP/g of dry soil)
	Benzo(b)naphtho(2.1-d)furane	2159	7.84E-03			
	Benzo(b)naphtho(1.2-d)furane	465	2.74E-02			
	Benzo(b)naphtho(2.3-d)furane	556	3.92E-02			
	11H-Benzo(a)Fluorene	581	2.05E-02			
	11H-Benzo(b)Fluorene	358	9.74E-02			
	Benzo(b)naphtho(2.1-d)thiophene	71	7.60E-02			
8	9-Fluorenone	4.5	2.40E-04	16	287±7	5% 65% with PAH (TEQ-Chim of PAH found in this fraction equals to 172 µg EQ-BaP/g of dry soil).
	Cyclopenta(def)phenanthrenone	19	1.40E-03			
	Benzo(b)naphtho(1.2-d)furane	12	2.74E-02			
	11H-Benzo(a)Fluorene	35	2.05E-02			
	11H-Benzo(b)Fluorene+7H-Benzo[c]fluorene	67	4.87E-2			
	Benzo(b)naphtho(2.1-d)thiophene	8.5	7.60E-02			
	Benzo(c)acridine	39	2.20E-03			
	Benzo(b)naphtho(1.2-d)thiophene	5	1.84E-03			
	Benzo(b)naphtho(2.3-d)thiophene	17	3.76E-02			
11h-benzo(a)fluorene-11-one	574	1.75E-02				
9	9-Fluorenone	43	2.40E-04	14	74±6	19%
	Cyclopenta(def)phenanthrenone	1777	1.40E-03			
	1.2-Benzo(a)anthraquinone	14	3.00E-02			
	5.12-Naphthacenequinone	1042	1.05E-02			
10	Cyclopenta(def)phenanthrenone	102	1.40E-03	0.25	48±5	1%
	Benzo(h)quinoleine	177	6.05E-04			
11	Cyclopenta(def)phenanthrenone	68	1.40E-03	0.1	31±7	0.3%
	11H-Benzo(a)carbazole	2	3.46E-03			
	7H-Benzo(c)carbazole	2	0.00E+00			
12	Cyclopenta(def)phenanthrenone	65	1.40E-03	0.1	11±1	0.9%
13	Cyclopenta(def)phenanthrenone	42	1.40E-03	0.06	39±9	0.1%
14	Cyclopenta(def)phenanthrenone	60	1.40E-03	0.1	41±11	0.2%
	Benzo(f)quinoleine	141.6	1.66E-04			
15					28±13	Any compound tested

#### iv. Discussion

---

##### 4.1. General observation of soil contamination

These results show that PAHs, although they are the main constituents of creosote are not the main contributors to the observed AhR activity. This study has allowed the identification of others ligands of the Ah receptor and highlight compounds that could present a risk from contaminated soils by creosote. The identified compounds are PAHs not included in US-EPA list, PAH oxidation products (Oxy-PAH) and polycyclic aromatic compounds with S-, O-, N-heterocycles (furans, thiophenes, carbazoles and quinolines). They may be present in significant concentrations in the soil (eg: as Benzo (b) naphtho (2,1-d) furan dosed at 2159 µg/gdw; Cyclopenta(def)phenanthrenone dosed at 1777 µg/g dw and 5,12-Naphthacenequinone dosed at 1042 µg/g dw) and involved in the biological effects observed.

##### 4.2. Separation procedure

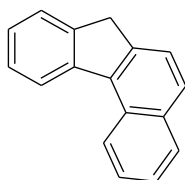
Fractionation by HPLC provided satisfactory separation of AhR activity among the fractions by isolating PAHs and alkylated PAHs in fractions 7 and 8 and the majority of Oxy-PAHs in fraction 9. With regard to the N-Heterocycles, their presence is observed in all fractions. Due to the rich PAH composition of creosote (Sundström et al., 1986), the fraction 7 and 8 were more complex than all other fractions but their activities have been mainly explained by identified compounds. This fractionation allows a complete separation for the majority of compounds even if some compounds are found in several fractions as the cyclopenta(def)phenanthrenone. This compound is found in seven different fractions but the fraction 9 totals 85% of the total concentration thereof. The injection in the HPLC of cyclopenta(def)phenanthrenone allows to observe an elution train of this compound that explains the distribution of this molecule in several fractions (data not shown). This result is in agreement with those obtained by Hartnik et al., (2007) where a similar fractionation method was applied, the presence of eight compounds in more than one fraction was observed

##### 4.3. Identification of AhR-active compounds in a creosote contaminated soil

41 ± 6% of the mixture AhR activity could be explained by identified compounds. It is partly due to the 16 PAHs from the list of US-EPA. But other compounds which are not part of the priority pollutants have been identified as ligands in the AhR and may present an environmental risk. Among them, the three following PAHs: the 7H-benzo[c]fluorene (weak inducer), the 11H-Benzo[b]fluorene and the 11H-Benzo[a]fluorene. Polycyclic aromatic compounds with N-, S-, O-heterocycles with the same structures as these three PAHs have also been identified and their AhR activities verified. There are for the O-heterocycles : the Benzo(b)naphtho(1,2-d)furan, the benzo(b)naphtho(2,1-d)furan and the benzo(b)naphtho(2,3-d)furan ; for S-heterocycles : the Benzo(b)naphtho(2,1-d)thiophene, the benzo(b)naphtho(1,2-d)thiophene and the benzo(b)naphtho(2,3-d)thiophene and for the N-Heterocycles : the 11H-Benzo(a)carbazole. The AhR activities of compounds with identical structures to 11H-Benzo[b]fluorene and 11H-Benzo[a]fluorene (Figure 3) are in the same order of magnitude ( $7.10^{-3} \leq \text{REP} \leq 10^{-2}$ ). The modification of a carbon atom by a hetero atom does not seem to influence the binding of these molecules to the receptor. However, the 7H-benzo(c)fluorene and the 7H-benzo(c)carbazol did not show AhR activity while their sulfur and oxygen analogous have been shown to be inducers of this biological response. A molecular docking test of these molecules with the Ah receptor has been undertaken, however these results could be explained by the model. Some biological effects of these compounds have been identified

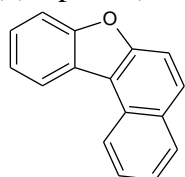
by others studies. The 7H-benzo[c]fluorene, the 11H-Benzo[b]fluorene and the 11H-Benzo[a]fluorene showed their ability to induce DNA adducts (Koganti et al., 2000) and the 11H-benzo[b]fluorene, its effects on the development of Danio rerio (Hawliczek et al, 2012; Legler and al., 2011). Regarding the Benzo(b)naphtho(2,1-d)thiophene, the benzo(b)naphtho(1,2-d)thiophene and the benzo(b)naphtho(2,3-d)thiophene, McFall et al. (1983) have shown that these compounds had a low mutagenic activity. However Benzo(b)naphtho(1,2-d)thiophene has shown its ability to induce DNA adducts (Carmichael et al. 1992). Regarding Benzo(b)naphtho(1,2-d)furan, the benzo(b)naphtho(2,1-d)furan, the benzo(b)naphtho(2,3-d)furan, the 7H-benzo(c)carbazole and the 11H-Benzo(a)carbazole, no study on their toxicities was found. The activities of these compounds allowed to identify the 2-phenylnaphthalene as an inducer due to its structural similarity to the 11H-Benzo [b] fluorene (induction which has been verified; Figure 3). Due to its very similar structure of these compounds, 1H-indene, 1- (phenylmethylene) - is probably an inducer of AhR activity and contributes to the activity of the fraction 7. However this compound is not commercially available and its activity has not been tested until now but it will be in the next study.

7H-benzo (c)fluorene



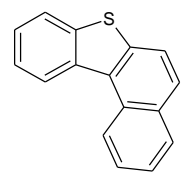
REP : N.D

Benzo(b)naphtho(1.2-d)furan



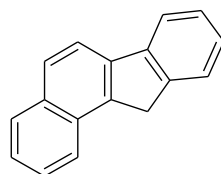
REP : 2.74E-02

Benzo(b)naphtho(1.2-d)thiophene



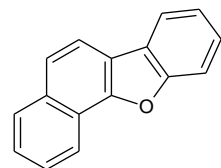
REP : 1.84E-03

11H-benzo(a)fluorene



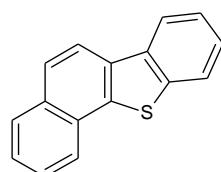
REP : 2.05E-02

Benzo(b)naphtho(2.1-d)furan



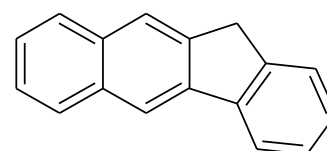
REP : 7.84E-03

Benzo(b)naphtho(2.1-d)thiophene



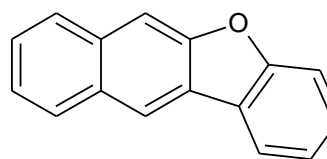
REP : 7.60E-02

11H-benzo(b)fluorene



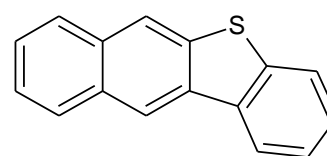
REP : 9.74E-02

Benzo(b)naphtho(2.3-d)furan



REP : 3.92E-02

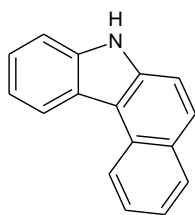
Benzo(b)naphtho(2.3-d)thiophene



REP : 3.76E-02

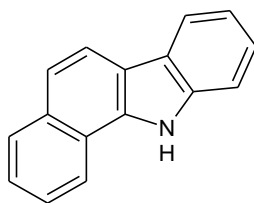


7H-Benzo(c)carbazole



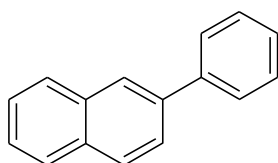
REP : N.D

11H-Benzo(a)carbazole



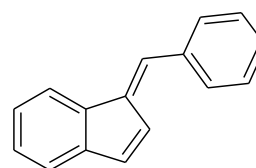
REP : 9.74E-02

2-phenylnaphthalene



REP : 1.05E-03

1H-indene. 1-(phenylmethylene)-



Molecule no-tested for its AhR/Activity

**Figure 3:** Structure of 7H-benzo(c)fluorene. 11H-benzo(a)fluorene and 11H-benzo(b)fluorene as well as their N-.S-.O-heterocyclics homolog identified in this study. Their REPs are also indicated. N.D : No determined. The structure of 2-phenylnaphthalene and 1H-indene. 1-(phenylmethylene)- are also illustrated to show their similarities (4.3. Identification of AhR-active compounds in a creosote contaminated soil).

The activity of Oxy-PAHs has also been compared to those of the parent compounds. For PAHs having no AhR activity, oxidation of these molecules (fluorene and cyclopenta(def)phenanthrene) leads to their ability to induce the biological response. However active compounds as 11H-Benzo[a]fluorene, oxidation does not influence the AhR response (REP 11H-Benzo [a] fluorene = 2,05E-02; REP 11H- Benzo (a) fluoren-11-one = 1,75E-02). Oxy-PAHs can be present in the original mixtures, but also generated by PAH biodegradation or oxidation processes (natural or used for soil remediation) (Lundstedt et al., 2007; Lundstedt et al., 2006; Eriksson et al 2000;. Chibwe et al, 2015). But these molecules are more polar than PAHs, making them more soluble in water and more mobile because of their lixiviation by the aqueous phase of the soil (Lundstedt, et al., 2007). In addition, these compounds showed acute toxicity on various organisms (Bacteria, aquatic invertebrate, microalgae terrestrial and aquatic plants) as well as oxydative stress, endocrine system disruption and cytotoxic effects in mammalian cell systems and mutagenic effect in many studies of toxicity (Lundstedt, et al., 2007; Wincent et al, 2015;. Chibwe et al, 2015). This raises the issue of environmental risk associated with these molecules and the introduction thereof in the environmental diagnostics polluted soil.

The N-heterocycles were also tested for their AhR activity. While phenanthrene is inactive for this activity (Louiz et al., 2008;. Jung et al, 2001), quinolines having the same structure as the compound (benzo(h)quinoline and benzo(f)quinoline) are active. These results agree with those of Jung et al., (2001) where they showed that the N-heterocycles have AhR activity higher or equivalent to their similar PAH structures for PLHC -1 cell line. Fractions 9-15 are mainly formed by this type of compounds. The activities of these fractions, poorly explained by the identified and biologically tested molecules in this study, suggest that the observed

activities are due mainly to the N-heterocycles present in (Table 3). The N-heterocycles have already shown their toxic effects on the microtox© (Hartnik et al., 2007) and on the development of fish *Danio rerio* (Hawliczek et al, 2012 ; Legler and al., 2011). Just like Oxy-PAH, these molecules are more polar than their structural analogues PAHs (Jung et al., 2001), raising the question of environmental risk associated with these compounds which can easily migrate with water and contaminated others media.

The AhR activities of the fractions 7 and 8 have been explained in majority (49% for fraction 7 and 65% for fraction 8). These fractions also contain the alkylated forms of PAHs which have already shown their ability to induce AhR activity in several studies (Piskorska-Pliszczynska et al, 1986;. Cheung et al., 1993; Machala et al., 2001b) . It would be interesting to biologically test these compounds and to dose them to assess their share of responsibility for the observed biological activity. They could explain the rest of the biological activity of these fractions and here for, they will be tested for their activity and dosed in fractions to know their part in the observe activity.

#### 4.4. *Limitations of the EDA approach*

The main difficulty associated with EDA lies in the confirmation of identified molecules. The standard compounds are often expensive or not commercially available. However, the confirmation step requires these standards for testing their biological activity and assaying them to assess their involvement in the observed biological activity. The second limitation is the identification by high resolution mass spectrometry (HRMS) due to the absence of many compounds in library spectra of molecules (here, the NIST) and the similarity of the mass spectra of many molecules that would require the use of spectrometry in tandem or to the power n (MS2 or MSn) to better differentiate them. The third limitation is the use of mass balance analysis involving the use of REP. It is very useful because it allows to assess the responsibility of a compound in the observed activity, but may overestimate or underestimate the share of activity attributable to test compounds. Larsson et al., (2014) showed that the additive model allows a good prediction of the AhR / EROD activity if the compounds were tested in mixtures, but that the prediction was not as good for the compounds taken individually. Indeed, the compounds may have different kinetics and different maximum of inductions of AhR / EROD activity (Louiz et al 2008;. Fent, 2001). In addition, the kinetics of this activity shows a dose response curve in bell-shaped (Fent, 2001) also observed during this work. Thus, the REPs are variables depending on the concentration of the compounds and it results in an error in the determination of the TEQ-Chim. It will be interesting to add at the confirmation stage, a comparison between the fractions activities and the reconstituted mixture of biologically active compounds identified to better estimate the observed AhR activity. However, this complicates the confirmation step and extends the effect directed-analysis which is already time consuming.

## **v. Conclusion**

---

The results of the study allowed to identify some known and unknown Ah receptor ligands present in soil contaminated by a complex mixture. The molecules responsible for AhR activity are PAHs but also their oxidation product (Oxy-PAH) and N-, O-, S-heterocycles. Currently, Oxy-PAH and N-, O-, S-heterocycles are not considered in environmental risks assessment whereas the toxicity of some of them have already been highlighted in several studies. Some Oxy-PAHs (eg: 9H-fluoren-9-one, cyclopenta (def) phenanthrenone,) have a AhR activity whereas their parent PAHs are inactive, raising questions of risk related to the PAHs degradation in soil by biological or chemical processes. It is the same for quinolines

such as benzo(f)quinoline and benzo(h)quinoline having the same structure as phenanthrene and having an AhR activity unlike the latter. Furthermore, these molecules have a higher polarity compare to PAHs making them more solubles in water and may them more readily to migrate in other environmental compartments as the aquatic environment. These results are consistent with incorporation of new molecules in the environmental risks assessment related to the contamination of soil by complex organic mixtures such as creosote.

## vi. Bibliography

---

- Blankenship, A.V.D., Sanderson, J.T., Cholger, S., Kemler, K., Murphy, M., Giesy, J.P. (2003). *Stand. Oper. Proced.* 1, 14. [blosloos/enviMass](https://github.com/blosloos/enviMass), 2014. <https://github.com/blosloos/enviMass>.
- Bols, N.C., Schirmer, K., Joyce, E.M., Dixon, D.G., Greenberg, B.M., Whyte, J.J., (1999). Ability of polycyclic aromatic hydrocarbons to induce 7-ethoxyresorufin-o-deethylase activity in a trout liver cell line. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 44, 118–128.
- Brack, W. (2003). Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 377(3), 397–407.
- Brack, W., Schirmer, K., (2003). Effect-directed identification of oxygen and sulfur heterocycles as major polycyclic aromatic cytochrome P4501A-inducers in a contaminated sediment. *Environmental Science & Technology*. 37, 3062–3070.
- Brack, W., Ait-aïssa, S., Burgess, R. M., Busch, W., Creusot, N., Di, C., Krauss, M. (2016). Effect-directed analysis supporting monitoring of aquatic environments — An in-depth overview. *Science of the Total Environment*. 544, 1073–1118.
- Carmichael, P. L., Ni Shé, M., Hewer, A., Jacob, J., Grimmer, G., Phillips, D. H. (1992). DNA adduct formation in mice following treatment with used engine oil and identification of some of the major adducts by <sup>32</sup>P-postlabelling. *Cancer Letters*. 64(2), 137–144.
- Cheung, Y.L., Gray, T.J., Ioannides, C. (1993). Mutagenicity of chrysene, its methyl and benzo derivatives, and their interactions with cytochromes P-450 and the Ah-receptor; relevance to their carcinogenic potency. *Toxicology* 81. 69-86.
- Chibwe, L., Geier, M. C., Nakamura, J., Tanguay, R. L., Aitken, M. D., Simonich, S. L. M. (2015). Aerobic Bioremediation of PAH Contaminated Soil Results in Increased Genotoxicity and Developmental Toxicity. *Environmental Science & Technology*. 150722094916008.
- Creusot, N., Aït-Aïssa, S., Tapie, N., Pardon, P., Brion, F., Sanchez, W., Thybaud, E., Porcher, JM., Budzinski H. (2014) Identification of synthetic steroids in river water downstream from pharmaceutical manufacture discharges based on a bioanalytical approach and passive sampling. *Environmental Science & Technology*. 1;48(7):3649-57.

- Eriksson, M., Dalhammar, G., Borg-Karlson, a K. (2000). Biological degradation of selected hydrocarbons in an old PAH/creosote contaminated soil from a gas work site. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 53(5), 619–626.
- Fent, K. (2001). Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicology in Vitro : An International Journal Published in Association with BIBRA*. 15(4-5), 477–88.
- Fetter, E., Krauss, M., Brion, F., Kah, O., Scholz, S., Brack, W. (2014). Effect-directed analysis for estrogenic compounds in a fluvial sediment sample using transgenic cyp19a1b-GFP zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology*. 154, 221–229.
- Garon, D., Krivobok, S., Seigle-Murandi, F. (2000). Fungal degradation of fluorene. *Chemosphere*. 40(1), 91–7.
- Grung, M., Lichtenthaler, R., Ahel, M., Tollefsen, K. E., Langford, K., Thomas, K. V. (2007). Effects-directed analysis of organic toxicants in wastewater effluent from Zagreb, Croatia. *Chemosphere*. 67(1), 108–120.
- Guillon, A., Le Ménach, K., Flaud, P.-M., Marchand, N., Budzinski, H., Villenave, E. (2013). Chemical characterization and stable carbon isotopic composition of particulate polycyclic aromatic hydrocarbons issued from combustion of 10 mediterranean woods. *Atmospheric Chemistry and Physics*. 13(5), 2703–2719.
- Hahn, M. E. (2002). Biomarkers and bioassays for detecting dioxin-like compounds in the marine environment. *The Science of the Total Environment*. 289(1-3), 49–69.
- Hartnik, T., Norli, H. R., Eggen, T., Breedveld, G. D. (2007). Bioassay-directed identification of toxic organic compounds in creosote-contaminated groundwater. *Chemosphere*. 66(3), 435–443.
- Hawliczek, A., Nota, B., Cenijn, P., Kamstra, J., Pieterse, B., Winter, R. Legler, J. (2012). Developmental toxicity and endocrine disrupting potency of 4-azapyrene, benzo[b]fluorene and retene in the zebrafish *Danio rerio*. *Reproductive Toxicology*. 33(2), 213–223.
- Houtman, C. J., Booij, P., Jover, E., Pascual del Rio, D., Swart, K., van Velzen, M., Lamoree, M. H. (2006). Estrogenic and dioxin-like compounds in sediment from Zierikzee harbour identified with CALUX assay-directed fractionation combined with one and two dimensional gas chromatography analyses. *Chemosphere*. 65(11), 2244–2252.
- Jung, D. K. J., Klaus, T., Fent, K. (2001). Cytochrome P450 induction by nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons, azaarenes, and binary mixtures in fish hepatoma cell line PLHC-1. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20(1), 149–159.
- Kaisarevic, S., Varel, U. L. V, Orcic, D., Streck, G., Schulze, T., Pogrmic, K., Kovacevic, R. (2009). Effect-directed analysis of contaminated sediment from the wastewater canal in Pancevo industrial area, Serbia. *Chemosphere*. 77(7), 907–913.

- Koganti, A, Singh, R., Rozett, K., Modi, N., Goldstein, L. S., Roy, T. A, Weyand, E. H. (2000). 7H-benzo[c]fluorene: a major DNA adduct-forming component of coal tar. *Carcinogenesis*. 21(8), 1601–1609.
- Larsson, M., Giesy, J. P., Engwall, M. (2014). AhR-mediated activities of polycyclic aromatic compound (PAC) mixtures are predictable by the concept of concentration addition. *Environment International*. 73, 94–103.
- Laville, N., Aït-Aïssa, S., Gomez, E., Casellas, C., Porcher, J.M. (2004). Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. *Toxicology*. Volume 196, Issues 1–2, Pages 41-55.
- Legler, J., van Velzen, M., Cenijn, P. H., Houtman, C. J., Lamoree, M. H., Wegener, J. W. (2011). Effect-directed analysis of municipal landfill soil reveals novel developmental toxicants in the zebrafish *Danio rerio*. *Environmental Science & Technology*. 45(19), 8552–8.
- Liscio, C., Abdul-Sada, A., Al-Salhi, R., Ramsey, M. H., Hill, E. M. (2014). Methodology for profiling anti-androgen mixtures in river water using multiple passive samplers and bioassay-directed analyses. *Water Research*. 57, 258–269.
- Louiz, I., Kinani, S., Gouze, M.-E., Ben-Attia, M., Menif, D., Bouchonnet, S., Porcher, J.M., Ben-Hassine, O.K., Aït-Aïssa, S. (2008). 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 Total Environment*. 402, 318–329.
- Lundstedt, S., Persson, Y., Öberg, L. (2006). Transformation of PAHs during ethanol-fenton treatment of an aged gasworks' soil. *Chemosphere*. 65(8), 1288–1294.
- Lundstedt, S., White, P A., Lemieux, C L., Lynes, K D., Lambert, I B., berg, L O., Haglund P., Tysklind, M. (2007). Sources, fate, and toxic hazards of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) at PAH contaminated sites. *Ambio a journal of the human environment*. 36(6), 475-485.
- Machala, M., Vondracek, J., Blaha, L., Ciganek, M., Neca, J.V. (2001). Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using in vitro reporter gene assay. *Mutation Research*. 497, 49-62.
- Marvin, C H., McCarry, B E., Villella, J., Allan, L M., Bryant D W. (2000) Chemical and biological profiles of sediments as indicators of sources of contamination in Hamilton Harbour. Part II: Bioassay-directed fractionation using the Ames Salmonella/microsome assay. Volume 41, Issue 7, Pages 989–999.
- Marvin, C. H., McCarry, B. E., Lundrigan, J. a., Roberts, K., Bryant, D. W. (1999). Bioassay-directed fractionation of PAH of molecular mass 302 in coal tar-contaminated sediment. *Science of the Total Environment*. 231(2-3), 135–144.
- Reemtsma, T., Putschew, A., Jekel, M. (1999). Industrial wastewater analysis: A toxicity-directed approach. *Waste Management*. 19(2), 181–188.

- Marvin, C. H., Tessaro, M., McCarry, B. E., Bryant, D. W. (1994). A bioassay-directed investigation of Sydney Harbour sediment. *Science of the Total Environment*. 156(2), 119–131.
- Mcfall, T., Booth, G. M., Lee, M. L., Tominaga, Y., Pratap, R., Tedjamulia, M., Castle, R. N. (1984). Mutagenic activity of methyl-substituted tri- and tetracyclic aromatic sulfur heterocycles. *Mutation Research*. 135, 97–103.
- Moret, S., Purcaro, G., Conte, L. S. (2007). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) content of soil and olives collected in areas contaminated with creosote released from old railway ties. *The Science of the Total Environment*. 386(1-3), 1–8.
- Oh, S. M., Kim, H. R., Park, H. K., Choi, K., Ryu, J., Shin, H. S., Chung, K. H. (2009). Identification of estrogen-like effects and biologically active compounds in river water using bioassays and chemical analysis. *Science of the Total Environment*. 407(21), 5787–5794.
- Panagos, P., Hiederer, R., Van Liedekerke, M., Bampa, F. (2013). Estimating soil organic carbon in Europe based on data collected through an European network. *Ecological Indicators*. 24, 439–450.
- Piskorska-Pliszczynska, J., Keys, B., Safe S., Newman, M.S. (1986). The cytosolic receptor binding affinities and AHH induction potencies of 29 polynuclear aromatic hydrocarbons. *Toxicology Letter*. 34,67-74.
- Reemtsma, T., Putschew, A., Jekel, M. (1999). Industrial wastewater analysis: A toxicity-directed approach. *Waste Management*. 19(2), 181–188.
- Regueiro, J., Matamoros, V., Thibaut, R., Porte, C., Bayona, J. M. (2013). Use of effect-directed analysis for the identification of organic toxicants in surface flow constructed wetland sediments. *Chemosphere*. 91(8), 1165–1175.
- Reineke, N., Bester, K., Hühnerfuss, H., Jastorff, B., Weigel, S. (2002). Bioassay-directed chemical analysis of River Elbe surface water including large volume extractions and high performance fractionation. *Chemosphere*. 47(7), 717–723.
- Schmitt, C., Streck, G., Lamoree, M., Leonards, P., Brack, W., De Deckere, E. (2011). Effect directed analysis of riverine sediments--the usefulness of *Potamopyrgus antipodarum* for in vivo effect confirmation of endocrine disruption. *Aquatic Toxicology Amsterdam Netherlands*. 101(1), 237–243.
- Schulze, T., Weiss, S., Schymanski, E., von der Ohe, P. C., Schmitt-Jansen, M., Altenburger, R., Brack, W. (2010). Identification of a phytotoxic photo-transformation product of diclofenac using effect-directed analysis. *Environmental Pollution*. 158(5), 1461–1466.
- Simon, E., Lamoree, M. H., Hamers, T., de Boer, J. (2015). Challenges in effect-directed analysis with a focus on biological samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 67, 179–191.

- Sundström, G., Larsson, L., Tarkpea, M., (1986). Creosote. In: Hutzinger, O. (Ed.), *Anthropogenic Compounds*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 159–205.
- Van Liedekerke, M., Prokop, G., Rabl-Berger, S., Kibblewhite, M., Louwagie, G. (2014), *Progress in the management of Contaminated Sites in Europe*, JRC Reference Reports, European Commission, Joint Research Centre, Luxembourg, accessed 30 June 2014.
- Vindimian, E., Robaut, C., Fillion, G. (1983). A method for cooperative and non cooperative binding studies using non linear regression analysis on a microcomputer. *Journal of Application Biochemistry*. 5, 261–268.
- Wincent, E., Jönsson, M. E., Bottai, M., Lundstedt, S., Dreij, K. (2015). Aryl hydrocarbon receptor activation and developmental toxicity in zebrafish in response to soil extracts containing unsubstituted and oxygenated PAHs. *Environmental Science & Technology*. 49(6), 3869–3877.
- Wölz, J., Brack, W., Moehlenkamp, C., Claus, E., Braunbeck, T., Hollert, H. (2010). Effect-directed analysis of Ah receptor-mediated activities caused by PAHs in suspended particulate matter sampled in flood events. *Science of the Total Environment*. 408(16), 3327–3333.

**2. Article 2 : Identification de ligands AhR présents dans un sol contaminé d'une usine de traitement de gaz par une approche d'analyse dirigée par l'effet.**

**Synthèse de l'article 2 :** L'application de l'EDA sur ce deuxième sol industriel a permis de confirmer l'efficacité de l'approche. Tout comme le premier article, une activité AhR a été observée dans les mêmes fractions que pour le sol contaminé par de la creosote. Certains composés comme les furanes sont en commun entre les deux sols. Cependant d'autres inducteurs ont été identifiés, dosés et leurs activités confirmées. Il s'agit du 5H-Benzo(b)carbazole possédant une activité AhR 10 fois supérieure au benzo(a)pyrène (BaP) et de deux HAP lourds, le Dibenzo(a,i)pyrene et le Dibenzo(a,h)pyrene (nombre de cycles égale à 6) présentant une activité biologique équivalente au BaP. Au final 19±7% de l'activité biologique du sol a pu être expliquée. Certains composés présentant des structures proches d'inducteurs connus sont suspectés d'être présents dans le sol étudié. Il s'agit du 1-(phenylmethylene)- et du 1,3,3-Triméthyl-1-phenylindane potentiellement présents dans la fraction 7 et des composés suivants : le 11H-Indeno(2,1-a)phénanthrène, le 2,2'-Binaphthalène, le 1H-indène-2-Phénylphénanthrène, le 13H-Dibenzo(a,h)fluorène et le 8H-Indéno[2,1-b]phénanthrène potentiellement présents dans la fractions 8. L'ensemble de ces composés ont des structures moléculaires très proche du Benzo(a)fluorène, du Benzo(b)fluorène et du Benzo(c)fluorène dosés et reconnus comme inducteur de l'activité AhR lors de l'étude du sol contaminé par de la créosote. Des investigations supplémentaires sont nécessaires afin de confirmer l'activité de ces composés et ainsi mieux expliquer l'activité biologique du sol.



**Article: Identification of AhR-ligands by an effect directed analysis approach in a contaminated soil of a gas treatment plant**

---

*Status: to submit*

Maximilien DELAFOULHOUZE<sup>1,2</sup>, Karyn LE MENACH<sup>1</sup>, Marie-Hélène DEVIER<sup>1</sup>, Emmanuel GENESTE<sup>1</sup>, Sélim AÏT-AISSA<sup>3</sup>, Jean-François LASCOURREGES<sup>2</sup> and Hélène BUDZINSKI<sup>1\*</sup>

1. Université de Bordeaux, UMR EPOC 5805 CNRS, LPTC, 351 cours de la Libération, 33405 Talence Cedex, France

2. Fondation Partenariale Innovasol, 1 allée F. Daguin - 33607 Pessac Cedex France

3. INERIS Parc technologique ALATA, 60550 Verneuil-en-Halatte France

\* Corresponding author. Tel.: +33 5 40 00 69 98

E-mail address: h.budzinski@epoc.u-bordeaux1.fr (H. Budzinski).

*Keywords: Effect directed analysis (EDA), Polycyclic aromatic hydrocarbon, Polychlorobiphenyl, Aryl hydrocarbon receptor (AhR), industrial soil*

**Abstract**

---

**Although industrial soils are contaminated by complex organic mixtures, the environmental risk assessments are still based on limited lists of molecules as the 16 PAHs from the US-EPA list. In this study, an effect directed-analysis (EDA) was performed to identify compounds binding the aryl hydrocarbon receptor (AhR) and inducing an Ethoxyresorufin 7-o-deethylase (EROD) activity.  $19 \pm 7\%$  of the biological activity of the soil was explained. It was due to PAH but also to N-, O-, S-heterocycles and Oxy-PAHs inducing AhR activity identified in a previous study. This work allowed to identify two heavy PAHs (the Dibenzo(ai)pyrene and dibenzo(ah)pyrene) as well as the 5H-Benzo(b)carbazole as strong inducers of this biological response. It also highlights compounds may have AhR activity due to their structural similarity with compounds whose biological activity is recognized. However, these molecules are not commercially available and their biological activity couldn't be confirmed. This study also helped to identify methylated PAH and polycyclic aromatic compounds (PAC) containing N-heterocycles as probable inducers of AhR response. Finally, these results are consistent with the EDA use for identification of biological active compounds in industrial polluted soils and the incorporation of new molecules in the environmental risks assessment.**

## I. Introduction

---

Soil is a resource with a slow turnover (Haygarth & Ritz, 2009) completing numerous ecosystem services (Boyd & Banzhaf, 2007 MEA, 2005; Daily, 1997). However, it suffers numerous threats to its functions and its quality (Blum, 2008). Thus, 52 million hectares of soil are affected by degradation processes in the European Union. This represents 16% of the territory (ESBN, 2008). One of the threats to European soils is the chemical contamination. The European Environment Agency estimates that over 2.5 million of potentially contaminated sites exist across Europe although only 1.2 million of them have already been identified (Panagos et al., 2013). The pollutants presents in majority are : metals and metalloids (35%), hydrocarbons (24%), chlorinated hydrocarbons (8%), polycyclic aromatic hydrocarbons (10%) and others (11%) (Van Liedekerke et al., 2014).

The soil contamination diagnostics are achieved through short lists of molecules. However soils, whose chemical contamination is organic, are often polluted with complex mixtures that may contain hundreds or even thousands of compounds (Cebren et al, 2013;. Andersson & Achten, 2015). The environmental risk associated with these contaminated soils is consequently underestimated. To identify the contaminants causing biological effects of contaminated soil, the use of bioanalysis and EDA seems a promising tool (Brack, 2003). Its use in several studies allowed to identify unknown contaminants having toxic effects in soils contaminated by complex mixtures (Legler et al, 2011;. Wincent et al, 2015;. Delafoulhouze et al, 2015).

Previously, we applied this approach to a creosote contaminated soil by combining a HPLC fractionation to the AhR activity measurement in the PLHC-1 fish cell line and analysis in Gas chromatography- Time of Flight (GC-ToF) (Delafoulhouze et al, 2015). In this study, several contaminants have been identified and their AhR activity confirmed. Among the identified compounds, the following 4 polycyclic aromatic compounds (PAHs): 11H-benzo (b) fluorene, 11H-benzo (a) fluorene, the 7H-benzo (b) Fluorene and 2-phenylnaphthalene but also polycyclic aromatic compounds (PAC) with N-,O-,S-heterocyclic analogues with the same structures were identified. Oxy-PAH and azarenes were also identified and for some of them, their AhR activity confirmed. These molecules, with sometimes higher AhR activity to their analogs PAHs are more mobile in the environment (Jung et al., 2001; Lundstedt, et al., 2007) and have shown their potential toxicity in several studies (Lundstedt, et al. 2007; Wincent et al, 2015 ;. Chibwe et al, 2015; Hawliczek et al, 2012;.. Legler and al, 2011), asking the environmental risk related to these molecules. Moreover, a EDA study on undergroundwater of a creosote contaminated site allowed to identify N-heterocycles as the most toxic compounds through the Microtox© test (Hartnik et al., 2007). This confirms that these compounds are toxic and can migrate to soil towards others environmental compartments. However, these compounds were identified only in creosote contaminated soils, so whether the compounds identified in the previous study present an environmental risk, it is interesting to verify if they are found in soils polluted by an other contamination source.

The purpose of this study is to apply the EDA approach on an industrial soil contaminated with a different organic mixture of creosote to identify the compounds responsible for the observed AhR activity. This will allow to confirm the effectiveness of the EDA approach applied to soils and check if the compounds identified in creosote contaminated soil are specific to this mixture or if they are identifiable in soils contaminated by other complex organic mixtures. In addition, this will allow to identify other compounds responsible for the AhR activity present in a differently contaminated soil. To conduct this study, a soil from a

gas processing plant was used and chemical analysis were performed by GC-ToF but also by liquid-chromatography coupled to a quadrupole and time of flight (LC-Q/ToF).

## II. Materials and methods

---

### 1. Chemicals and reagents

All solvents used were at least of HPLC grade quality and were purchased from Atlantic Labo (Bruges, France). Methanol (MeOH), n-pentane, n-hexane and acetonitrile (ACN) (HPLC grade quality) come from J.T. Baker and dichloromethane (DCM) and isooctane were purchased from Atlantic Labo (Bruges, France). Milli-Q grade water was prepared from a Milli-Q water purification system using an EDS-PAK filter (Millipore SA, Guyancourt, France). Formic acid (99 % purity) contained in 1 mL individual vial was supplied by Atlantic Labo (Bruges, France). All the compound standards and the deuterated surrogate standards (>98% purity) were obtained from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France), from CIL Cluzeau (Sainte-Foy-La-Grande, France) and from Chiron, provided by BCP Instruments (Oullins, France).

Dimethylsulfoxid (DMSO) (biological reagent grade quality) was provided by Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France). All biological reagents for cell culture and bioassays were provided by Fisher Scientific (Illkirch, France). Ligands of AhR were purchased from Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France). Azote and helium were provided by Linde (France).

### 2. Site description and sampling

The study site was a gas processing plant situated in south of France. Soils were taken in Aout 2014 by shovel and directly sifted at 4 mm. After three days of drying, they were again sifted at 2 mm. They were kept at room temperature in amber jars until utilisation. 11 soils were sampled and after quick analysis and screening, one of them was kept for effect directed analysis.

### 3. Soil extraction by pressurized liquid extraction (PLE)

0,1g dried (dw) soil sample was extracted in duplicate by PLE (ASE 200, Dionex Voisins le Bretonneux, France). Briefly, the soil was placed in 11 mL stainless steel extraction cells and the dead volume filled with previously cleaned glass beads. For blank protocol, the extraction was done only on beads without matrix. Extraction was performed with a mixture of methanol (MeOH)/dichloromethane (DCM) (1/1, v:v) at a temperature of 75°C and a pressure of 100 bars. Four cycles of static extraction were done for 5 min and extraction cell was purged for 60s with nitrogen. The 25 mL extract volume were concentrated under a stream of nitrogen, resulting in a final volume of 1.8 mL in MeOH/DCM (1/1; v:v) for storage and kept at -20°C until fractionation.

### 4. Fractionation by normale phase-HPLC (NP-HPLC)

300 µL of soil extract were redissolved in n-hexane after evaporation to dryness (100%) and 250 µL were fractionated by NP-HPLC. The 50 µL remaining of the remainder of the supernatant n-hexane was evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen and reconstituted in DMSO for in vitro bioassay to test its AhR activity before fractionation. The HPLC system was composed of a quaternary pump (Agilent Technologies P1200), a diode array detection system (Agilent Technologies P1200) operated from 190 nm to 400 nm, an

autosampler (Agilent Technology P1200), a column thermostat (Agilent Technologies P1200) and an automatic fraction collector (Agilent Technologies infinity 1260), and equipped with a NH<sub>2</sub> column (Microsorb NH<sub>2</sub> 100- 5, 4,6 x 250 mm, Varian®) (Agilent technologies, Les Ulis, France) was used. Fractionation was performed at a flow rate of 1 mL/min using n-pentane, DCM and acetonitrile as mobile phase under the following gradient conditions: initial condition of 100% n-pentane for 7 min, followed by a linear gradient to 100% DCM within 10 min and held 5 min and then by a linear gradient to 100% acetonitrile within 4 min, held for 4 min, followed by a re-equilibration time to the initial conditions (run time of X min). The fractions were collected every 2 min from 0 to 40 min, resulting in 20 HPLC fractions. The fractions were dried under a gentle stream of nitrogen and redissolved in 250 µL DCM. For the EROD assay, a 100 µL aliquot was dried and redissolved in 100 µL DMSO. 50 µL of each fraction were pooled, also dried and redissolved in 50 µL DMSO to compare the activity of the pooled fractions to those of the raw PLE extract and the supernatant extract. The rest of each fraction (100µL) was kept in DCM for analysis by gas-chromatography coupled to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (GC-QTOF-MS). Before each fractionation a standard solution of 16 standards with LogP between 3,17 and 11,24 were injected to check the quality of experiment and any changing in retention times.

#### 5. Targeted analysis of priority chemicals in soil sample

Analysis (in triplicat) were carried out on the 16 PAHs of US-EPA list and 26 polychlorobiphenyls (PCBs) (CB 8, 18, 28, 29, 44, 50, 52, 66, 77, 87, 101, 104, 105, 118, 126, 128, 138, 153, 170, 180, 187, 188, 195, 201, 206 and 209). PCB were extracted on ASE 200 System (Dionex, Voisins le Bretonneux, France), purified and analyzed on an HP 5890 series II gas chromatograph (Hewlett–Packard, Avondale, MA) coupled to a 63Ni electron capture detector (ECD) according the method previously used by Tapie et al., 2011.

For PAH, the selected soil was extracted by PLE with the following parameters. Extraction was performed with dichloromethane at a temperature of 100°C and a pressure of 100 bars. Two cycles of static extraction were done for 8 min and extraction cell was purged for 60s with nitrogen. Then PAH were purified on alumina and silica microcolumns as previously describe by Guillon et al., (2013). Analysis of soil crude extract (in triplicat) was carried out on the 16 US-EPA PAHs, benzo[e]pyrene and dibenzothiophene (Table 1) by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) (Agilent Technologies 6890 GC and 5973 MS, Waghäusel, Germany) (Guillon et al., 2013). Activity contribution of PAHs (Chem-TEQ) was also determined by using the REPi (Louiz et al., 2008)..

#### 6. 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) assay in using PLHC-1 cell line and cell viability

The PLHC-1 cell line (ATCC , CRL-2406), derived from topminnow (*Poeciliopsis Lucida*) hepatocellular carcinoma, was routinely cultured in Eagle's Essential Medium (MEM) supplemented with 10% foetal bovine serum, 1 mM sodium pyruvate, 1 mM non-essential amino acids, 50 U/mL penicillin G and 50 µg/mL streptomycin, under controlled atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 30°C. When 90% of confluence was reached, cells were dissociated with 0.05% (w/v) trypsin EDTA for subculturing and experiments. For experiments, cells were seeded in 96-well plates (TPP®, Dominique Dutcher SAS, Brumath, France) at 5.104 cells/well (100 µL) and allowed to grow for 24h. On test day, cells were exposed in triplicat to serial dilutions of BaP (reference ligand), soil extract or fractions for 4h (PAH-like activity) before reading by a spectrofluorimeter (Synergy 2 Biotek®, Colmar, France) during 10 min

and using the 530/590 wavelength. In parallel, cellular viability was tested for different concentrations of soil extract by using the methyl-thiazol-tetrazolium (MTT) assay, as previously described by Laville et al. (2004).

#### 7. AhR activity analysis, calculation of bio-TEQ, chem-TEQ and use of mass balance analysis.

Dose–response curves were modelled by using the Regtox 7.5 Microsoft Excel™ macro (Vindimian et al., 1983). This macro uses the Hill equation model and allows calculation of EC20 (concentrations of test chemical or soil extract that induce 20% of maximal response). Bioassay-derived BaP- (BaP-EQ) were determined by dividing the EC20 of the reference chemical (BaP expressed in g/L) by that of the soil extract or its HPLC fractions (expressed as equivalent gram of dry soil per litre).

Activity contribution of compounds (Chem-TEQ) was determined using the chemical concentrations in soil ( $C_i$ ) and the relative equivalent potency of tested chemical ( $REPi$ ) obtained by ratio of EC20 of Benzo(a)pyrene (the reference compound) on EC20 of tested compound (Louiz et al., 2008). Chem-TEQ is the result of the following equation : chem-TEQ =  $\Sigma (C_i \times REPi)$ . Finally, Chem-TEQ was compared to the toxic-equivalent derived from bioassays activities (Bio- TEQ) which is the ratio of the EC20 of Benzo(a)pyrene (the reference chemicals, in g/L) to that of the sample (or fraction) expressed as equivalent gram per liter (g EQ/L).

#### 8. Chemical analysis of actif fractions by high resolution mass spectrometry (HRMS)

##### 8.1. Analysis of actif fractions by GC-QTOF-MS

Analyses are performed by gas chromatography (GC, 7890 Series B, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) coupled to a hybrid mass spectrometer Q-TOF (Series 7200, Agilent Technologies, Santa Clara, USA). The data acquisition was performed in MS mode and by using HP-5MS column ((Agilent technologies, Massy, France) 5 % Phényle- 95 % Méthyle-siloxane (30 m x 250  $\mu$ m x 0,25  $\mu$ m). Fractions were injected pulsed splitless flow at a temperature of 280 ° C. The molecules were separated by the following temperature gradient: 50 ° C for 2 min, 2 ° C.min<sup>-1</sup> to 325 ° C, final temperature maintained for 0.5 min. The acquisition takes place over a period of 145 min. The compounds were ionized by electron impact at 70 eV. The mass range of 50 m / z 500 m / z is scanned at a frequency of 2 GHz. Before each analysis, analytical instrument performance (resolution, mass accuracy, and sensitivity) were verified using standard compounds (PAHs, control card). If a parameter does not meet the unit is recalibrated to adjust the resolution and the masses.

The chromatographic data are processed with the software MassHunter Qualitative (Agilent Technologies). The treatment is only done manually. Peaks in the chromatogram (TIC: total ion chromatogram) are analyzed individually. After obtaining the mass spectrum of a peak, the background noise is removed using the mass spectrum of TIC baseline. Then the resulting spectrum is compared with the NIST11 spectral database. If a molecule is identified, a research on ChemSpider and PubChem database is performed to obtain its characteristics and check if it is known to have AhR activity.

##### 8.2. Analysis of actif fractions by LC-QTOF-MS

The analyzes are performed only on fractions 13 to 16 with HPLC chain (1209 Infinity Series, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) coupled to a hybrid QTOF mass spectrometer (6540 Series, Agilent Technologies, Santa Clara, USA). The compounds were separated on a

column of silica grafted with an alkyl chain of 18 carbon atoms (Kinetex® C18, 100 x 2.1 mm, 1.7 microns) (Phenomenex, Agilent Technologies, Les Ulis, France). Elution solvents employed are ultrapure MilliQ water filtered on EDS-PAK and acetonitrile. In positive ionization mode, formic acid is added to each solvent to 0.1%. 2µl of fractions were injected with A flow of 0.3 mL/min where elution started with a mixture of Water/ACN (v:v ; 9:1), followed by a linear gradient to 100% of ACN within 45 min and held 2 min and then a re-equilibration (6 min). The operating conditions for the ESI source were as follows: source temperature 300°C, gas flow rate 8 L.min<sup>-1</sup>, capillary voltage 3000 V, nebulizer gas pressure 40 psi, sheath gas temperature 400°C, nozzle voltage 1500 V and fragmentor 110 V. The instrument was operated in 2 GHz. The data acquisitions were performed using (data-dependent) auto-MS/MS acquisition mode. In the same run, the most abundant precursor ions are selected from a TOF mode scan and then fragmented in MS/MS mode (Q-TOF). MS spectra were acquired with a scan range of 70 - 1700 m/z. The most abundant precursor ions were isolated in width of ~1.3 amu and fragmented with three fixed collision energies : 10, 20 and 40 eV. A constant flow of an Agilent TOF reference solution through the reference nebulizer allowed the system to continuously correct for any mass drift by using the reference mass ion HP-921 [hexakis-(1H,1H,3H-tetrafluoropropoxy)-phosphazine] at m/z 922.009798 [M+H]<sup>+</sup>. Before all injection, stability of mass accuracy was checked with an Agilent standard solution and the system was re-calibrated if values went above 0.2 ppm error. A standard solution containing 36 compounds was injected before the sample to check the retention time of compounds and the instrumental sensitivity.

The data were processed using the MassHunter Qualitative software (version B.05.00, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). A compound screening was performed on the total ion chromatogram using the molecular feature extraction (MFE) which is an untargeted feature finding algorithm of the software. Only peaks with intensity > 1500 counts were searched. The elemental formulae were generated using relative isotopic abundance of mass spectra profiles and precursor ion mass. The composition were defined by Generate Formulas function of the software. The calculation of most probable molecular formula included the common elements C, H, N, O, S, Cl, F, P, score higher than 50 % and a error margin of 5 ppm. The same procedure was performed on the samples and blanks associated protocols. The generated list of molecules detected in the samples and the blanks are then compared via MassProfiler software (Agilent Technologies, France). The fragmentation mass spectrum was compared to MS/MS spectra include in exhaustive spectral libraries namely Metlin, Forensics and MassBank. When no MS/MS spectra were reported, molecular formulas were searched in compound database specifically Chemspider

#### *9. Activity and chemical confirmation of contaminants*

For compounds whose standards are commercially available. The confirmation is carried out at three levels by testing standard for its AhR / EROD activity, by injecting HPLC to verify that its elution fraction corresponds to that in which it was identified and by dosing it by the GC/MS For an active molecule, the REPi was determined as the ratio of EC20 of Benzo(a)pyrene on EC20 of tested compound (Table 4). For active compounds, their concentrations in the fractions were determined through targeted analysis by GC-MS using external calibration and the same parameters than the PAH analysis. The AhR activity part of the compounds in fractions was determine by using Chem-TEQ calculation.

#### *10. Quality control*

In all assays, each sample or compound was tested at various concentrations in triplicat, which always included both negative controls (solvent), positive control (TCDD and BaP) and complete dose response for reference chemical (TCDD for modelisation of dose-reponse

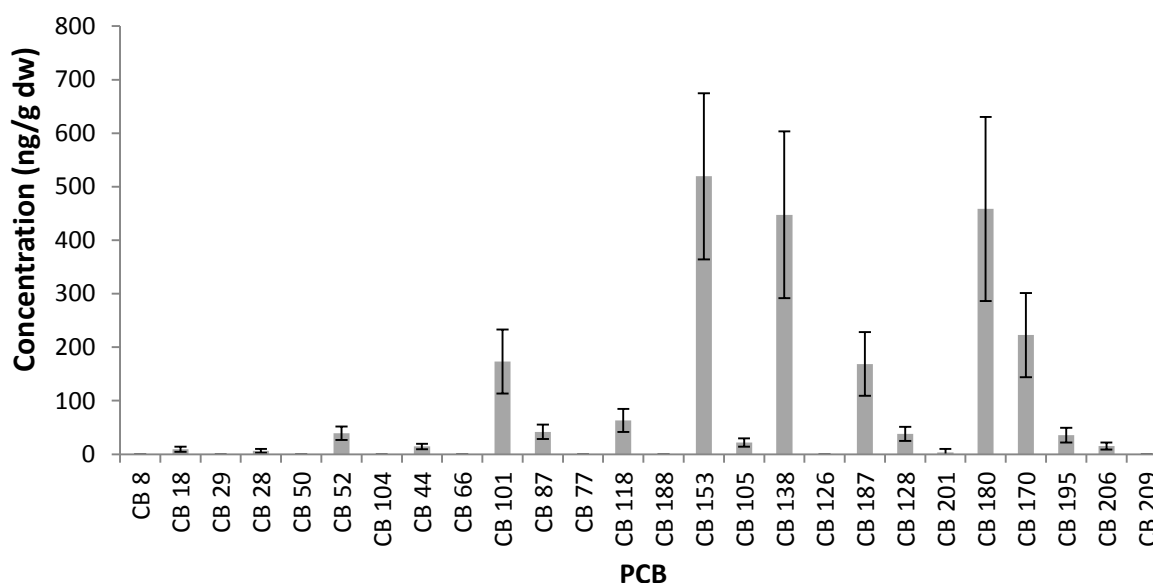
curve and BaP for determining REPi or Bio-TEQ). A blank protocol following each steps of any samples was also tested to check no contamination due to the manipulation. Before each experiment, the glassware was washed and pyrolyzed to ensure no cross-contamination takes place.

### III. Results

#### 1. PAH and PCB contents of studied soil

The study showed a PAHs and PCBs soil contamination. The total concentration of the 16 PAHs of US-EPA list is  $158.9 \text{ mg/g dw}$  (Table 1). PAHs having a number of cycles greater than or equal to 4 are more represented that the light PAH (lower number of cycles at 4 cycles). The soil has an AhR activity with a Bio-TEQ =  $1232 \pm 120 \text{ mg EQ-BaP/g dw}$ . By applying a mass balance analysis (MBA) from REP provided by Louiz et al. (2007), the AhR activity explained by these 16 PAHs is  $8 \pm 1\%$  (Table 1).

Figure 1 shows the concentrations of 26 dosed PCBs into the soil. The total PCBs concentration was  $2278 \pm 789 \text{ ng/g dw}$ . The main PCBs represented are the PCBs 101 ( $173 \pm 60 \text{ ng/g}$ ), the PCB 118 ( $63 \pm 21 \text{ ng/g}$ ), the PCB 153 ( $520 \pm 155 \text{ ng/g}$ ), the PCB 138 ( $447 \pm 156 \text{ ng/g}$ ), the PCB 187 ( $169 \pm 60 \text{ ng/g}$ ), the PCB 180 ( $459 \pm 172 \text{ ng/g}$ ) and the PCB 170 ( $223 \pm 78 \text{ ng/g}$ ). The main detected PCBs are not known to be inducers of AhR response (Della Torre et al., 2013) and were not identified in the biologically active fractions.



**Figure 1** : Concentration (ng/g) of 26 PCBs in the studied soil. Analysis were performed in triplicat (n=3)

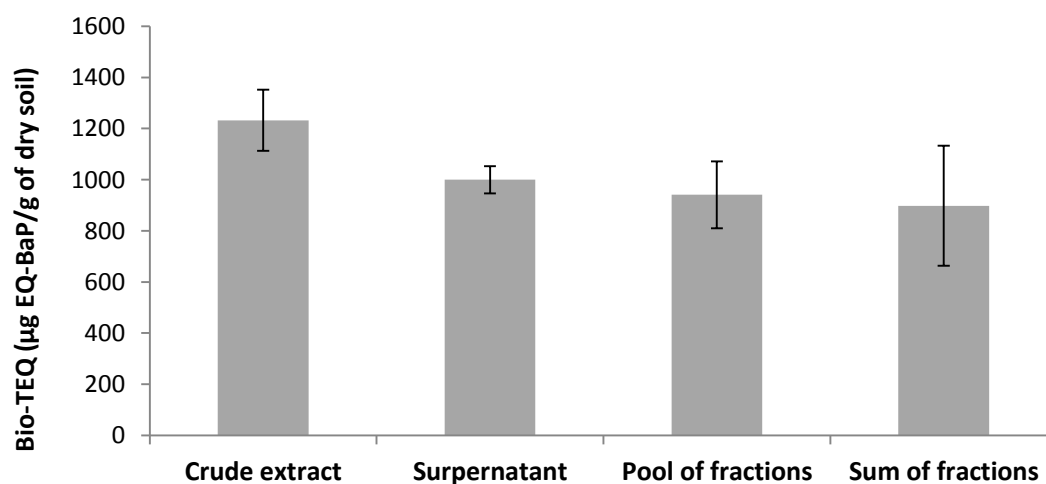
Concentrations of priority PAHs in the soil sample ( $\mu\text{g/g dw}$ ) and REPs		
Compound	Concentration ( $\mu\text{g/g}$ of dry soil)	REP BaP 4h (louiz and al. 2008)
Naphtalene	1.3	$n.i^{(a)}$
Phenanthrene	12.3	$n.i^{(a)}$
Anthracene	4.2	$n.i^{(a)}$
Acenaphtylene	0.1	$5.56E^{-03(a)}$
Acenaphtene	1.8	$n.i^{(a)}$

Fluorene	1.7	n.i <sup>(c)</sup>
Fluoranthene	18.5	n.i <sup>(a)</sup>
Pyrene	16.2	3.58E <sup>-03(a)</sup>
Benzo(a)anthracene	14.4	2.58E <sup>-01(a)</sup>
Chrysene	15.5	2.92E <sup>-01(a)</sup>
BBF and BKF	27.7	6.94E <sup>-01</sup> (BbF) and 2.94 (BkF) <sup>(a)</sup>
Benzo(a)pyrene	16.9	n.i
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	12.8	1 <sup>(a)</sup>
Dibenzo(ah)anthracene	3.5	8.43E <sup>-01(a)</sup>
Benzo(g,h,i)perylene	12	3.66 <sup>(a)</sup>
$\Sigma$ HAP	158.9	
Percentage of AhR activity explained by the measured PAHs (%)		
Chem-TEQ ( $\mu$ g EQ-BaP/g dw)	99	
Bio-TEQ ( $\mu$ g EQ-BaP/g dw)	1232 $\pm$ 120	
% of AhR activity explained	8 $\pm$ 1	

**Table 1** : PAH content of the analysed soil ( $\mu$ g/g) and the REPs of Acenaphthylene, Pyrene, Benzo(a)anthracene, Chrysene, Benzo(b)fluoranthene, Benzo(k)fluoranthene, Benzo(a)pyrene, Indeno(1.2.3-cd)pyrene et Dibenzo(ah)anthracene. Comparaison between the experimental AhR-activity (Bio-TEQ) and the theoretical activity based on additif effects (Chem-TEQ). n.i : non inductor of AhR activity in the range of tested concentrations (2  $\mu$ g/L to 2 mg/l). (a) : compound tested for its AhR in a previous study (Louis et al., 2008).

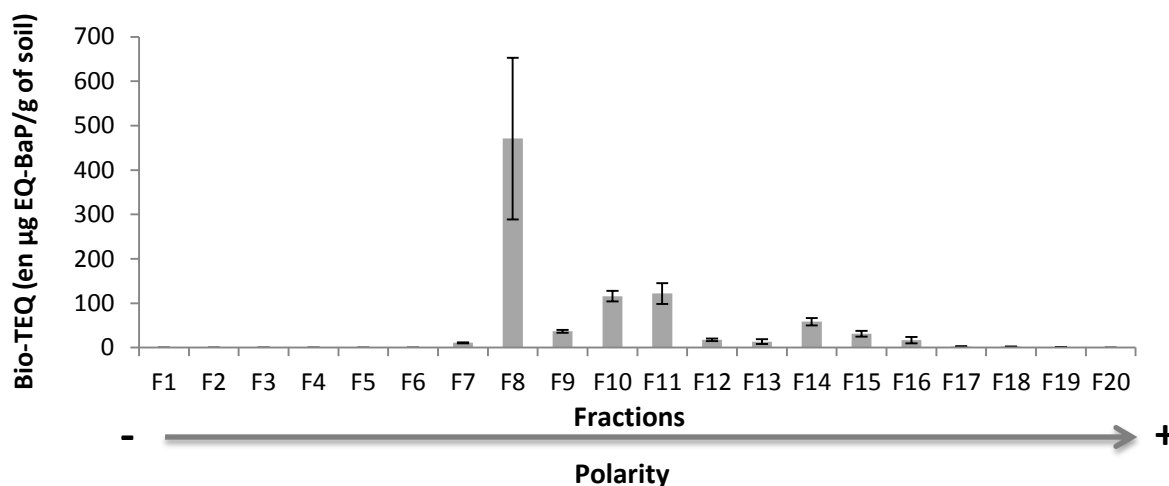
## 2. Fractionation and AhR activity of fractions

The crude extract was fractionated and tested for its AhR activity. The results of fractionation are presented in Figures 2 and 3. Figure 2 shows the evolution of the sample activity during the effect-directed analysis. No difference was observed between the crude extract (bio-TEQ = 1232  $\pm$  120  $\mu$ g EQ-BaP / g dw), the supernatant injected into HPLC (bio-TEQ = 1000  $\pm$  53  $\mu$ g EQ-BaP/g dw) and the pool of fractions (bio-TEQ = 941  $\pm$  131  $\mu$ g EQ-BaP/g dw), which shows the effectiveness of the fractionation procedure. The AhR activity sum of fractions (bio-TEQ = 900  $\pm$  233  $\mu$ g EQ-BaP/g dw) is equivalent to the biological activity of the pool of fractions respecting the additive effects model for the induction of AhR activity.





**Figure 2** : AhR activities of extract for 4h of PLHC-1 exposure after different steps of fractionation. Crude extract : Extract tested for its activity after PLE extraction. Supernatant : Extract tested for its activity after solubilisation in hexane and recovery of supernatant. Pool of fractions : Activité of global extract after fractionation and pool of all fractions. Sum of fractions : sum of fractions activities. Results are expressed as  $\mu\text{gEQ-BaP/g}$  (mean  $\pm$  SD. n = 3).



**Figure 3** : AhR activities of all fractions after 4h of PLHC-1 exposure. Fractions were collected all 2 minutes and the elution follows a gradient from the less polar solvent (pentane) to the more polar solvent (acetonitrile).

The activity is shared between fractions 7 and 16 with the majority of activity present in fractions 8 (Bio-TEQ=470 $\pm$ 182 mg EQ-BaP/g of dw), 10 (Bio-TEQ=115  $\pm$ 12 EQ-BaP mg/g dw) and 11 (Bio-TEQ=122 $\pm$ 23  $\mu\text{g EQ-BaP/g}$  dw) which totalized for 78% of the total AhR activity.

### 3. Chemical composition of the active fractions

The active fractions were analyzed by GC-ToF-MS and the more polar fractions (fraction 13 to 16) by LC-Q/ToF-MSMS. Analyses in GC-ToF have identified compounds in fractions 7 to 12. However, no molecule could be identified in the fractions 13 to 16 by this analysis technique (Table 2). The fraction 7 and 8 are essentially composed of PAHs and alkylated PAH as well as polycyclic aromatic compounds (PAC) containing N-,O-, S-heterocycles already identified in a previous study (Delafoulhouze et al, 2015). The fraction 9 contains only Oxy-PAHs and a carbazole methylated. For fractions 10 and 11, the identified compounds are N-heterocycles (carbazoles and quinolines) and a azaarene (Benzo(a) anthracene-7-carbonitrile).

Analysis by LC-Q/ToF of fractions 13-16 did not allow the identification of specific compounds but have allowed the identification of empirical formulas of the present compounds. Among these compounds, many of them are composed of carbon, nitrogen and hydrogen. By performing research on public databases such as PubChem or ChemSpider these empirical formulas are associated only with azaarenes or quinolines (several possible structural formulas).

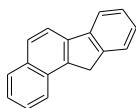
#### 4. AhR activity of identified compounds

Some molecules were tested for their AhR activity through a MBA, the biological activity due to these compounds was determined (Table 3). The activity accounted for the entire mixture is  $19 \pm 7\%$ . Fractions 8 (26%) and 10 (30%) have activities which are the most explained.

Only 14% of AhR activity in the fraction 7 could be explained, it is due to molecules previously identified in soil contaminated with creosote (Delafoulhouze et al, 2015). Two molecules to nearby structures of compounds with AhR confirmed activities, have also been identified. There are the 1H-indene, 1- (phenylmethylene) - and 1,3,3-trimethyl-1-phenylindan (Figure 4).

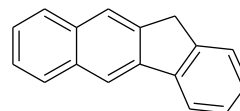
In fraction 8, the part of the biological activity due to the identified and assayed molecules was only 5% (Table 3). Among the compounds present in fraction 8, 5 heavy PAH (number of cycles  $\geq 6$ ) have by identified and tested for their AhR activity. Coronene, Dibenzo(a,e)pyrene and Dibenzo(a,l)pyrene didn't have AhR activity. However Dibenzo(a,i)pyrene (DBaiP) and Dibenzo(a,h)pyrene (DBahP) induced a AhR response (Figure 5) and have a biological activity equivalent to Benzo(a)pyrene (REP DBaiP = 1.36 and REP DBahP = 0.83). Three other heavy PAHs are also present in this fraction but have not been identified. Among the identified molecules are present the 11H-Indeno(2,1-a)phenanthrene, the 8H-Indeno(2,1b)phenanthrene, the 13H-Dibenzo(a,h)fluorene, 2-Phenylphenanthrene and the 2,2'-Binaphthalene (Figure 3) as well as three of these four S-heterocycles (Dinaphtho(1,2-b:1',2'-d)thiophene, Dinaphtho(1,2-b:2',3'-d)thiophene, Dinaphtho(1,2-b:2',1'-d)thiophene, Benzo(b)phenanthro(3,2-d)thiophene) having all of them a nearby structures of 11H-Benzo(b)fluorene and 11H-Benzo(a)fluorene, molecules whose AhR activity has already been confirmed.

11H-benzo(a)fluorene (fraction 7 et 8)



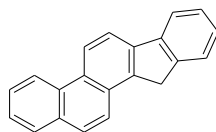
REP : 2.05E-02

11H-benzo(b)fluorene (fractions 7 et 8)



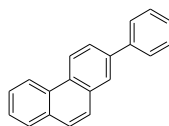
REP : 9.74E-02

11H-Indeno(2,1-a)phenanthrene (fraction 8)



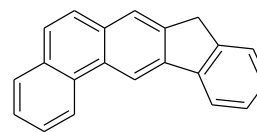
Molecule no-tested for its AhR activity

2-Phenylphenanthrene (fraction 8)



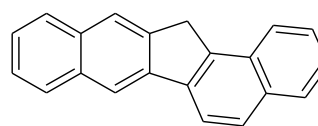
Molecule no-tested for its AhR activity

8H-Indeno[2,1-b]phenanthrene (fraction 8)



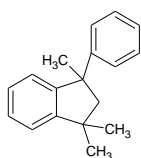
Molecule no-tested for its AhR activity

13H-Dibenzo(a,h)fluorene (fraction 8)

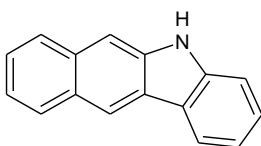


Molecule no-tested for its AhR activity

1,3,3-Trimethyl-1-phenylindan (fraction 7)

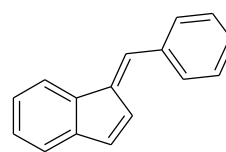


Molecule no-tested for its AhR activity  
5H-Benzo(b)carbazole (fraction 10)

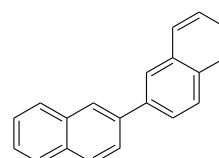


REP : 10

1H-indene, 1-(phenylmethylene)- (fraction 7)



Molecule no-tested for its AhR activity  
2,2'-Binaphthalene (fraction 8)



Molecule no-tested for its AhR activity

**Figure 4:** Structure of 11H-benzo(a)fluorene and 11H-benzo(b)fluorene as well as others PAH identified with similarity of structures. If compounds could be tested for their AhR activity, their REPs are indicated.

**Table 2** : Compounds identified (and their CAS number) in each active fractions by GC/ToF. Coumpounds in bold have their AhR activity known

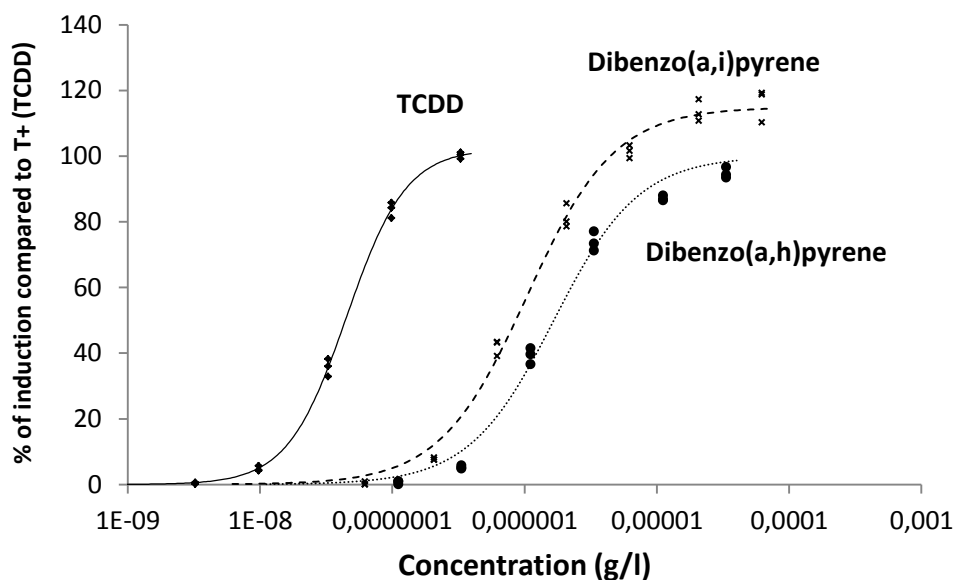
<p>Fraction 7</p>	<p><u>PAH</u> : <b>Fluorene</b> (86-73-7), <b>Phenanthrene</b> (85-01-8) and alkylated phenanthrenes, <b>Anthracene</b> (120-12-7) and alkylated anthracenes, <b>4H-Cyclopenta[def]phenanthrene</b> (203-64-5), <b>Naphthalene, 2-phenyl-</b> (612-94-2), <b>Pyrene</b> (129-00-0) and alkylated pyrenes, <b>Fluoranthene</b> (206-44-0) and alkylated fluoranthenes, <b>Pyrene, 4,4-dihydro-</b> (6628-98-4), <b>7H-Benzo[c]fluorene</b> (205-12-9), <b>11H-Benzo[b]fluorene</b> (243-17-4), <b>11H-Benzo[a]fluorene</b> (238-84-6), <b>1H-indene, 1-(phenylmethylene)-</b>, <b>Cyclopenta(cd)pyrene</b> (27208-37-3), <b>Cyclopenta(cd)pyrene, 3,4-dihydro-</b> (25732-74-5), <b>Benzo(c)phenanthrene</b> (195-19-7), 1,3,3-Trimethyl-1-phenylindan (3910-35-8)</p> <p><u>O-Heterocycle(s)</u> : <b>Benzo(b)naphtho(1,2-d)furane</b> (205-39-0), <b>Benzo(b)naphtho(2,1-d)furane</b> (239-30-5), <b>Benzo(b)naphtho(2,3-d)furane</b> (243-42-5), <b>2H-Phenanthro[9,10-b]pyran</b> (217-67-4), <b>1-phenyldibenzofuran</b> (63317-69-1), <b>Naphtho(2,1,8,7-klmn)xanthene</b> (191-37-7)</p> <p><u>S-Heterocycle(s)</u> : <b>Dibenzothiophene</b> (132-65-0) and alkylated dibenzothiophene, <b>Phenaleno[1,9-bc]thiophene</b> (79965-99-4), <b>Benzo[b]naphtho[2,1-d]thiophene</b> (239-35-0),</p> <p>3 no-identified compounds</p>
<p>Fraction 8</p>	<p><u>PAH</u> : <b>Fluoranthene</b> (206-44-0), <b>Pyrene</b> (129-00-0), <b>7H-Benzo[c]fluorene</b> (205-12-9), <b>11H-Benzo[b]fluorene</b> (243-17-4), <b>11H-Benzo[a]fluorene</b> (238-84-6), <b>Cyclopenta (cd)pyrene</b> (27208-37-3), <b>Benzo(c)phenanthrene</b> (195-19-7), <b>Benz[a]anthracene</b> (56-55-3) and alkylated <b>Benz[a]anthracenes</b>, <b>Chrysene</b> (218-01-9) and alkylated chrysenes, <b>Cyclopenta(cd)pyrene, 3,4-dihydro-</b> (25732-74-5), <b>Phenanthrene, 2-phenyl</b> (4325-77-3), <b>Anthracene, 2-phenyl</b> (602-55-1), <b>2,2'-Binaphthalene</b> (612-78-2), <b>Benzo(b)fluoranthene</b> (205-99-2), <b>Benzo(k)fluoranthene</b> (207-08-9), <b>Benzo(j)fluoranthene</b> (205-82-3), <b>Benzo(e)pyrene</b> (192-97-2), <b>Benzo(ghi)fluoranthene</b> (203-12-3), <b>Indeno[1,2,3-cd]pyrene</b> (193-39-5), <b>Dibenzo(ah)anthracene</b> (53-70-3), <b>Benzo(ghi)perylene</b> (191-24-2), <b>Benzo(a)pyrene</b> (52-32-8) and alkylated <b>benzo(a)pyrene</b>, <b>Perylene</b>(198-55-0), <b>Benzo(b)triphenylene</b> (215-58-7), <b>Benzo(b)chrysene</b> (214-17-5), <b>Indeno(1,2,3-cd)fluoranthene</b> (193-43-1), <b>11H-Indeno(2,1-a)phenanthrene</b> (220-97-3), <b>8H-Indeno(2,1-b)phenanthrene</b> (241-28-1), <b>13H-Dibenzo(a,h)fluorene</b> (239-85-0)</p> <p><u>Heavy PAH (6 rings)</u> : <b>Coronene</b> (191-07-1), <b>Dibenzo(a,e)pyrene</b> (192-65-4), <b>Dibenzo(a,i)pyrene</b> (189-55-9), <b>Dibenzo(ah)pyrene</b> (189-64-0), <b>Dibenzo(al)pyrene</b> (191-30-0) and 3 others unidentified heavy PAHs</p> <p><u>Oxy-PAH</u> : <b>11H-Benzo[a]fluoren-11-one</b>(479-79-8),</p> <p><u>N-Heterocycle(s)</u> : <b>Benz[c]acridine</b> (225-51-4), <b>Dinaphtho(1,2-b:1',2'-d)thiophene</b> (207-94-3), <b>Dinaphtho(1,2-b:2',3'-d)thiophene</b> (239-94-</p>

	<p><i>1), Dinaphtho(1,2-b:2',1'-d)thiophene (207-72-5), Benzo(b)phenanthro(3,2-d)thiophene (241-32-7)</i></p> <p><u>S-Heterocycle(s)</u> : <i>Benzo(b)naphtho(1,2-d)thiophene (205-43-6), Benzo(b)naphtho(2,3-d)thiophene (243-46-9), Benzo[b]naphtho[2,1-d]thiophene (239-35-0)</i></p> <p><i>4 no-identified compounds</i></p>
Fraction 9	<p><u>Oxy-PAH</u> : <i>9H-Fluoren-9-one (486-25-9), 9,10-Anthracenedione (84-65-1), 7H-Benz(de)anthracen-7-one (82-05-3), 5,12-Naphthacenedione (1090-13-7), Benz(a)anthracene-7,12-dione (2498-66-0),</i></p> <p><u>N-Heterocycle(s)</u> : <i>1 Alkylated carbazole</i></p>
Fraction 10	<p><u>N-Heterocycle(s)</u> : <i>Benzo(h)quinoline (230-27-3), 9H-Carbazole-9-methanol (2409-36-1), 4H-Benzo[def]carbazole (203-65-6), 11H-Benzo(a)carbazole (239-01-0), 5H-Benzo(b)carbazole (243-28-7)</i></p>
Fraction 11	<p><u>N-Heterocycle(s)</u> : <i>11H-Benzo(a)carbazole (239-01-0), 7H-Benzo(c)carbazole (205-25-4),</i></p> <p><u>Azaarene</u> : <i>Benzo(a)anthracene-7-carbonitrile (7476-08-6)</i></p>
Fraction 12	<p><u>Azaarene</u>: <i>Benzo(a)anthracene-7-carbonitrile (7476-08-6)</i></p>
Fractions 13-14-15-16	<p><i>Any compound found in GC-ToF</i></p>

**Table 3** : Identified compounds having a AhR activity with their calculated REPs (see section 3.4. Characterization of the potential AhR activity of some identified compounds). their concentrations in the soil NP-HPLC fractions where they have been identified (in µg/g dw), the theoretical activity (Chem-TEQ), the experimental activity (Bio-TEQ) and the contribution in AhR activity of the associated fraction.

Fraction	Compounds	Concentration (µg/g of dry soil)	REP (BaP 4h)	Chem-TEQ (µg EQ-BaP/g of dry soil)	Bio-TEQ (µg EQ-BaP/g of dry soil)	Contribution (%)
7	Naphthalene, 2-phenyl-	2.2	1.05E-03	1.52	10±1	15.2%
	Benzo(b)naphtho(2,1-d)furane	8.2	7.84E-03			
	Benzo(b)naphtho(1,2-d)furane	1.8	2.74E-02			
	Benzo(b)naphtho(2,3-d)furane	5.2	3.92E-02			
	11H-Benzo(a)Fluorene	10.6	2.05E-02			
	11H-Benzo(b)Fluorene + 7H-Benzo[c]fluorene	9.7	4.87E-2			
	Benzo(b)naphtho(2,1-d)thiophene	6.8	7.60E-02			
8	11H-Benzo(a)Fluorene	1.1	2.05E-02	21.6	471±182	5%. 26% if the 16 PAH of US-EPA list are taken into account.
	11H-Benzo(b)Fluorene+7H-Benzo(c)Fluorene	1.7	0.0487			
	11H-benzo(a)fluorenone	4.3	1.75E-02			
	Benzo(b)naphtho(2,1-d)thiophene	0.5	7.60E-02			
	Benzo(c)acridine	3.8	2.20E-03			
	Benzo(b)naphtho(1,2-d)thiophene	0.6	1.84E-03			
	Benzo(b)naphtho(2,3-d)thiophene	2.8	3.76E-02			
	Dibenzo(ai)pyrene	14.3	1.36E+00			
Dibenzo(ah)pyrene	2.2	8.30E-01				
9	9-Fluorenone	0.9	2.40E-04	0.2	37±3	0.5%
	1,2-Benzo(a)anthraquinone	0.8	3.00E-02			
	5,12-Naphthacenequinone	15.8	1.05E-02			
10	Benzo(h)quinoléine	0.3	6.05E-04	35	116±12	30%
	11H-Benzo(a)carbazole	0.2	3.46E-03			
	5H-Benzo(b)carbazole	3.4	10			
11	11H-Benzo(a)carbazole	4.2	0.00346	0.01	122±23	0.01%
	7H-Benzo(c)carbazole	5	0			

The fraction 10 contains the 5H-Benzo(b)carbazole, a N-heterocycle with the same structure as the 11H-benzo(b)fluorene (Figure 3) and that explains 29% of AhR activity observed for this fraction.



**Figure 5** : Dose–response for EROD induction by TCDD, Dibenzo(a,i)pyrene and Dibenzo(a,h)pyrene after 4h of exposure in the PLHC-1 cell line. Values are means of triplicates±SD.

#### IV. Discussion

##### 1. General observation of soil contamination

The EDA applied to the soil shows that fractionation by normal phase HPLC is effective and allows separation of the compounds. This is the second soil on which we practice this approach and it allowed in the two studies, the identification of contaminants responsible of AhR activity supposing a possible generalization of this analysis technique for identification of contaminants of interest.

The studied soil presents a AhR activity due to a contamination by PAHs and PACs. 16 PAH of US-EPA list and molecules recognized as inducers identified in a previous study (Delafoulhouze et al, 2015) explain only  $19 \pm 7\%$  of the observed activity indicating that the majority of compounds responsible for AhR activity were not confirmed. The activity is predominantly in fractions 8, 10 and 11 which are responsible for 78% of the observed effects, the molecules of interest are to be found in these three fractions.

A PCBs contamination was observed in the soil of this gas treatment plant. However PCBs were not found in the active fractions meaning their eluting is located in the fractions not having biological activity. The measured PCBs are not inducers of AhR activity (Della Torre et al., 2013) and can not be identified by the employed approach here. Generally, PCBs are contaminants in soils at low concentrations (Vane et al, 2014;.. Melnik et al, 2015) where they are present in the scale of ng/g against the  $\mu\text{g/g}$  scale for PAHs. In addition, only the PCB126 shows a strong induction of AhR response while the other PCBs are weak inducers (Della

Torre et al., 2013). These compounds should be extracted on larger amounts of soil and purifications realized to detect the inducers PCB of AhR response. However, this does lose the interest of EDA approach and the search for compounds in unknown.

Finally, it should be noted that the compounds identified as inducers of AhR activity in a contaminated soil by creosote (Delafoulhouze et al, 2015) were also found in the soil contaminated by a petroleum mixture of different origin (gas treatment plant). This means that these contaminants are present in soil contaminated with different kinds of mixtures and enhances the interest to follow these compounds during the environmental risk assessment.

## *2. Possible compounds responsible for the AhR activity observed*

To explain the observed AhR activity in fraction 8, several compounds are candidates. Indeed many compounds with similar structures to 11H-Benzo(a)fluorene and 11H-Benzo(b)fluorene (inducers of AhR activity) were identified as the 11H-Indeno(2,1-a)phenanthrene, the 8H-indeno(2,1b)phenanthrene, the 13H-Dibenzo(a,h)fluorene, 2-Phenylphenanthrene, the 2,2'-binaphthalen (Figure 3), the Dinaphtho(1,2-b:1',2'-d)thiophene, the Dinaphtho(1,2-b:2',3'-d)thiophene, the Dinaphtho(1,2-b:2',1'-d)thiophene and the Benzo(b)phenanthro(3,2-d)thiophene. These compounds have never been studied for their toxicity or for their AhR activity. Moreover, standards are not marketed, which makes the study of these compounds tedious. Other candidates to explain the activity of this fraction are the methylated forms of inducers PAH such as chrysene, benzo(a)anthracene and benzo(a)pyrene that have also been identified. The methylated forms of benzo(a)pyrene and benzo(a)anthracenes have never been studied for their AhR activity however the methylated forms of chrysene have already shown their potential induction of this biological response in rats (Cheung et al., 1993). Therefore, these compounds are interesting to study to verify their AhR activity and their presence in soils polluted by organic mixtures because they may pose an environmental risk.

As regards the fractions 9, 10 and 11, the 9H-Carbazole-9-methanol, the 4H-Benzo [def] carbazole, the methylated carbazoles and Benzo(a)anthracene-7-carbonitrile should be tested biologically. Indeed, these are the only compounds identified by GC-ToF in these fractions that have not been tested for their AhR activity and they could explain the remainder of the observed activity. These compounds have also been little studied, only the 9H-Carbazole-9-methanol and the methylated forms of carbazole have already shown their mutagenic potential in a study (Lavoie et al., 1982). Given that the nitrogen form of 11H-benzo(b)fluorene has a higher activity than the same PAH structure (Figure 5); that in a previous study we showed that quinolines of the same structure as phenanthrene showed a AhR activity unlike the latter and carbazole and its methylated forms have previously implicated as probable inducers (Delafoulhouze et al, 2015) ; it is possible that all of these compounds are strong inducers of AhR activity and responsible for all of the observed activity.

## *3. Limitations of the approach*

In a previous study, we have already discussed the limitations associated with the REP use and EDA approach (Delafoulhouze et al, 2015). Again, the main problem comes from the purchase of identified compounds. The majority of them are not sold and have not been tested. The activity of these compounds remains a guess based on their structural similarity to known inducers. However as attested by 11H-benzo (b) fluorene (REP = 9,74E-2) and the 5H-Benzo (b) carbazole (REP = 10), structural changes can significantly alter the activity of the test compounds. Therefore, it is possible that these inducers can present a strong AhR activity. Finally, although the analysis LC-Q/ToF have not identified specific molecular structures but these analyzes can be complementary with the analyzes in GC/ToF.



## V. Conclusion and perspective

---

The results of the study allowed to identify some known and unknown Ah receptor ligands present in soil contaminated by a complex mixture. The molecules responsible for AhR activity are PAHs but also their oxidation product (Oxy-PAH) and N-,O-,S-heterocycles. Heavy PAHs as the Dibenzo(ai)pyrene and the Dibenzo(ah)pyrene have shown a high potential for the AhR activity induction. Some compounds with similar structures to AhR inducers were identified but not tested for their activity. A future study will be to test these compounds and check their AhR activity to compare them. These results are consistent with incorporation of heavy PAHs in the environmental risks assessment of contaminated sites and more generally to an enlargement of compounds list for the environmental risk assessment of soils.

## VI. Bibliography

---

- Andersson, J. T., Achten, C. (2015). Time to Say Goodbye to the 16 EPA PAHs? Toward an Up-to-Date Use of PACs for Environmental Purposes. *Polycyclic Aromatic Compounds*, (June 2015), 1–25.
- Blum, W. E. H. (2008). Characterisation of soil degradation risk: an overview. *Threats to Soil Quality in Europe*. [http://eusoiils.jrc.ec.europa.eu/esdb\\_archive/eusoiils\\_docs/other/EUR23438.pdf](http://eusoiils.jrc.ec.europa.eu/esdb_archive/eusoiils_docs/other/EUR23438.pdf)
- Boyd, J., Banzhaf, S. (2007). What are ecosystem services? The need for standardized environmental accounting units. *Ecological Economics*, 63(2-3), 616–626.
- Brack, W. (2003). Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377(3), 397–407.
- Cébron, A., Faure, P., Lorgeoux, C., Ouvrard, S., Leyval, C. (2013). Experimental increase in availability of a PAH complex organic contamination from an aged contaminated soil: Consequences on biodegradation. *Environmental Pollution*, 177(July), 98–105.
- Cheung, Y. L., Gray, T. J. B., Ioannides, C. (1993). Mutagenicity of chrysene, its methyl and benzo derivatives, and their interactions with cytochromes P-450 and the Ah-receptor; relevance to their carcinogenic potency. *Toxicology*, 81(1), 69–86.
- Chibwe, L., Geier, M. C., Nakamura, J., Tanguay, R. L., Aitken, M. D., Simonich, S. L. M. (2015). Aerobic Bioremediation of PAH Contaminated Soil Results in Increased Genotoxicity and Developmental Toxicity. *Environmental Science & Technology*, 150722094916008.
- Daily, G.C. (1997). *Nature's Services: Societal Dependence on Natural Ecosystems*. Island Press, Washington.
- Delafoulhouze, M., Le Menach, K., Aït-Aïssa, S., Lascourreges, J-F., Atteia, O. Budzinski, H. (2015). Application of effect-directed analysis to identify organic pollutants in industrial soil polluted by creosote. Article to submit

- Della Torre, C., Mariottini, M., Malysheva, A., Focardi, S. E., Corsi, I. (2013). Occurrence of PCDD/PCDFs and PCBs in soil and comparison with CYP1A response in PLHC-1 cell line. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 94, 104–111.
- ESBN (European Soil Bureau Network). (2008). *Soils Atlas of Europe*. [http://eusoiils.jrc.ec.europa.eu/projects/soil\\_atlas/download/109.pdf](http://eusoiils.jrc.ec.europa.eu/projects/soil_atlas/download/109.pdf)
- Guillon, a., Le Ménach, K., Flaud, P.-M., Marchand, N., Budzinski, H., Villenave, E. (2013). Chemical characterization and stable carbon isotopic composition of particulate Polycyclic Aromatic Hydrocarbons issued from combustion of 10 Mediterranean woods. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 13(5), 2703–2719.
- Hartnik, T., Norli, H. R., Eggen, T., Breedveld, G. D. (2007). Bioassay-directed identification of toxic organic compounds in creosote-contaminated groundwater. *Chemosphere*, 66(3), 435–443.
- Hawliczek, a., Nota, B., Cenijn, P., Kamstra, J., Pieterse, B., Winter, R. Legler, J. (2012). Developmental toxicity and endocrine disrupting potency of 4-azapyrene, benzo[b]fluorene and retene in the zebrafish *Danio rerio*. *Reproductive Toxicology*, 33(2), 213–223.
- Haygarth, P. M., Ritz, K. (2009). The future of soils and land use in the UK: Soil systems for the provision of land-based ecosystem services. *Land Use Policy*, 26(SUPPL. 1), 187–197.
- Jung, D. K. J., Klaus, T., Fent, K. (2001). Cytochrome P450 induction by nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons, azaarenes, and binary mixtures in fish hepatoma cell line PLHC-1. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(1), 149–159.
- LaVoie, E. J., Briggs, G., Bedenko, V., Hoffmann, D. (1982). Mutagenicity of substituted carbazoles in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 101(2), 141–150.
- Legler, J., van Velzen, M., Cenijn, P. H., Houtman, C. J., Lamoree, M. H., Wegener, J. W. (2011). Effect-directed analysis of municipal landfill soil reveals novel developmental toxicants in the zebrafish *Danio rerio*. *Environmental Science & Technology*, 45(19), 8552–8.
- Lundstedt, S., White, P A., Lemieux, C L., Lynes, K D., Lambert, I B., berg, L O., Haglund P, Tysklind, M. (2007). Sources, fate, and toxic hazards of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) at PAH contaminated sites. *Ambio a journal of the human environment*. 36(6), 475-485.
- Melnyk, a., Dettlaff, a., Kuklińska, K., Namieśnik, J., Wolska, L. (2015). Concentration and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in surface soil near a municipal solid waste (MSW) landfill. *Science of The Total Environment*, 530-531, 18–27.
- Millennium Ecosystem Assessment. (2005). *Ecosystems and Human Well-being: A Framework for Assessment*. Island Press, Washington, DC.

- Panagos, P., Hiederer, R., Van Liedekerke, M., Bampa, F. (2013). Estimating soil organic carbon in Europe based on data collected through an European network. *Ecological Indicators*, 24, 439–450.
- Tapie, N., Menach, K. Le, Pasquaud, S., Elie, P., Devier, M. H., Budzinski, H. (2011). PBDE and PCB contamination of eels from the Gironde estuary: From glass eels to silver eels. *Chemosphere*, 83(2), 175–185. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.12.044
- Van Liedekerke, M., Prokop, G., Rabl-Berger, S., Kibblewhite, M. Louwagie, G. (2014), Progress in the management of Contaminated Sites in Europe, JRC Reference Reports, European Commission, Joint Research Centre, Luxembourg, accessed 30 June 2014.
- Vane, C. H., Kim, A. W., Beriro, D. J., Cave, M. R., Knights, K., Moss-Hayes, V., Nathanail, P. C. (2014). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and polychlorinated biphenyls (PCB) in urban soils of Greater London, UK. *Applied Geochemistry*, 51, 303–314.
- Vindimian, E., Robaut, C., Fillion, G. (1983), A method for cooperative and non cooperative binding studies using non linear regression analysis on a microcomputer. *J. Appl. Biochem.* 5, 261–268.
- Wincent, E., Jönsson, M. E., Bottai, M., Lundstedt, S., Dreij, K. (2015). Aryl Hydrocarbon Receptor Activation and Developmental Toxicity in Zebrafish in Response to Soil Extracts Containing Unsubstituted and Oxygenated PAHs. *Environmental Science & Technology*, 49(6), 3869–3877.

### 3. Application 3 : Analyse dirigée par l'effet d'une boue de station d'épuration : boue pouvant servir comme amendement sur les sols industriels pollués.

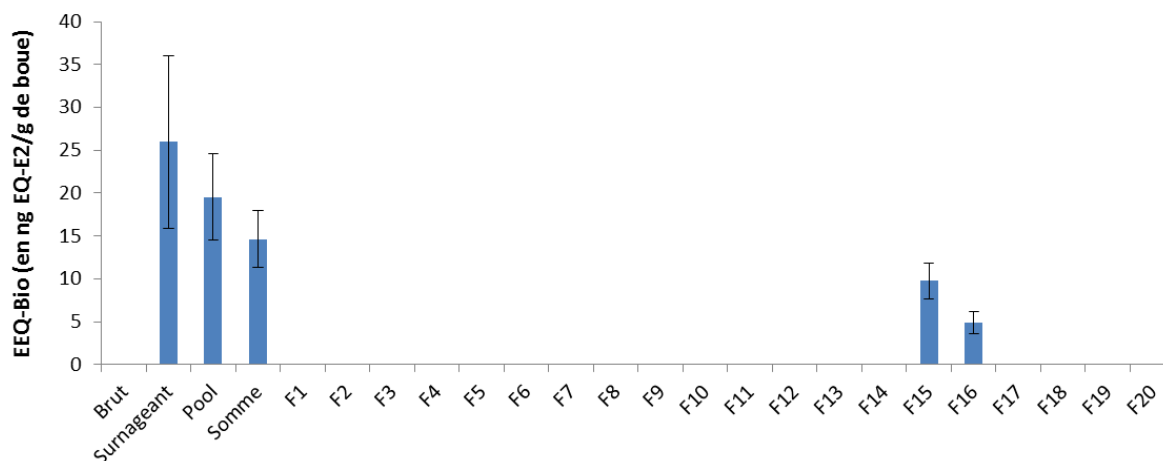
La méthode d'analyse dirigée par l'effet a également été testée pour une boue de station d'épuration afin de vérifier si la méthode est applicable à des matrices très riches en matière organique et savoir si ces boues peuvent être utilisées comme amendement sur les sols pollués afin de recréer un environnement favorable à la microfaune.

La boue a été testée pour son activité œstrogénique et son activation du récepteur Ah impliquant l'activité EROD. Les résultats sont présentés ci-dessous.

#### 1. *Activité biologique de l'extrait brut et des différentes fractions*

##### 1.1. Activité œstrogénique

L'extrait de boue n'a pas présenté lors du test sur l'extrait brut d'activité œstrogénique. Cependant après le passage de l'extrait dans l'hexane où la matière organique précipite, une activité œstrogénique a pu être observée (Figure 56). L'activité de l'extrait après passage dans l'hexane est de  $26 \pm 10$  ng EQ-E2/g de boue sèche suivie d'une diminution de l'activité suite au fractionnement mais non significative (activité œstrogénique du pool =  $20 \pm 5$  ng EQ-E2/g de boue sèche). En comparant le pool et la somme des fractions, aucune différence significative n'est observée ce qui signifie que l'activité œstrogénique est additive. Suite au fractionnement, l'activité œstrogénique de la boue se répartit entre les fractions 15 et 16.



**Figure 56** : Activité œstrogénique de la boue issue de la station d'épuration Louis Fargues après les différentes étapes de l'analyse dirigée par l'effet ainsi que celle des fractions associées à l'échantillon (n=3). Les données sont exprimées en ng-equivalent œstradiol par gramme de boue sèche (ng EQ-E2/g de boue sèche).

L'œstrone (n° CAS : 53-16-7) et l'œstradiol (n° CAS : 50-28-2) sont tout deux des ligands naturels au récepteur des œstrogènes (ER) qui sont élués dans les fractions 15 et 16 respectivement lors d'un fractionnement en phase normale (annexe 1). C'est pourquoi ces deux molécules ont été dosées par chromatographie en phase liquide afin de déterminer leur concentration dans ces fractions et l'activité œstrogéniques due à ces composés.

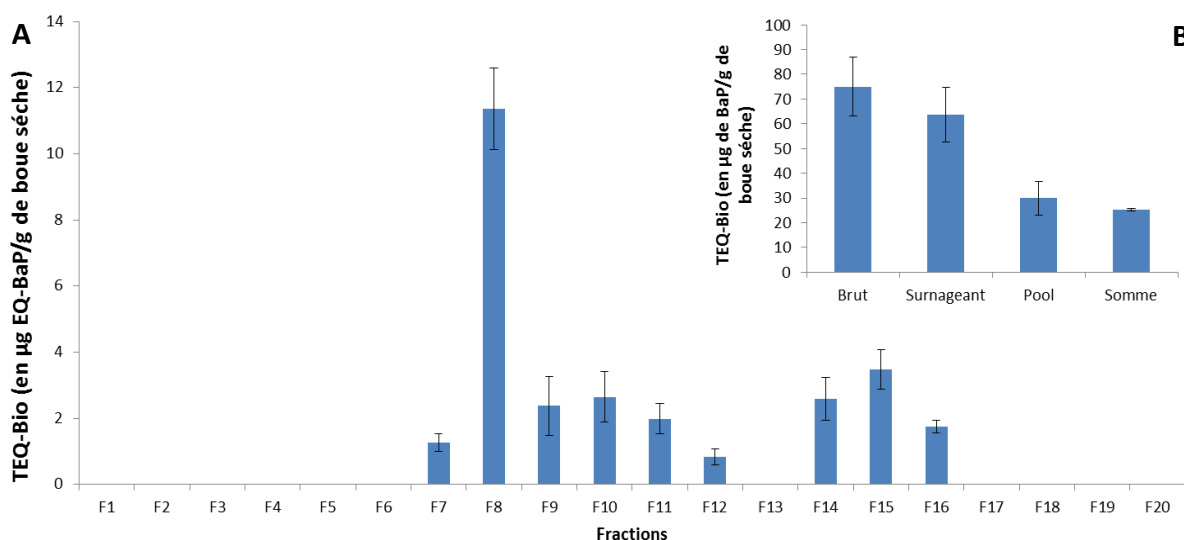
**Tableau 42** : Concentration en œstrone et œstradiol des fractions 15 et 16 de la boue Louis Fargue et pourcentage d'activité expliqué par ces composés. n=3

Composé	Fraction	TEF	Concentration (ng/g de boue sèche)	TEQ-chim (ng EQ-E2/g de boue sèche)	TEQ-bio (ng EQ-E2/g de boue sèche)	% d'activité expliquée
Œstrone	15	0,2	63	12,6	10±2	100±3,7
Œstradiol	16	1	4	4	5±1	80±23

L'œstradiol et l'œstrone expliquent l'ensemble de l'activité des fractions 15 et 16.

### 1.2. Activité AhR

La boue présente une activité AhR uniquement après 4h d'exposition (Figure 57). Le signal disparaît après 24h d'exposition signifiant que l'ensemble des inducteurs présents dans les fractions sont rapidement métabolisés par les cellules. L'activité de l'extrait brut est de 75±12 µg EQ-BaP/g de boue sèche, celle du surnageant injecté en HPLC est de 64±11 µg EQ-BaP/g de boue sèche et celle du pool de 30±7 µg EQ-BaP/g de boue sèche. Ces valeurs signifient que le processus de fractionnement est à l'origine d'une perte de l'activité de moitié. Etant donné que la somme des activités des fractions (TEQ-bio = 25±1 µg EQ-BaP/g de boue sèche) est équivalente à celle du pool des fractions, cette perte d'activité est due à la perte de composés et non à des effets de synergie entre les composés. Ces résultats sont cohérents avec les résultats obtenus pour l'activité AhR pour les sols et le respect de l'additivité des effets pour cette activité biologique. En comparant l'activité de l'extrait brut de la boue (TEQ-bio = 75±12 µg EQ-BaP/g de boue sèche) à celles des deux sols étudiés (TEQ-bio<sub>sol p9</sub> = 1688 ± 140 µg EQ-BaP / g de sol sec ; TEQ-bio<sub>sol 168</sub> = 1232 ± 120 µg EQ-BaP / g de sol sec), cette dernière est bien inférieure.



**Figure 57** : Activité AhR après 4h d'exposition des cellules PLHC-1. A : répartition de l'activité entre les fractions. B : activité de l'extrait à différentes étapes du traitement de l'échantillon. n=3

Suite au fractionnement, l'activité AhR est répartie de la fraction 7 à la fraction 12 et de la fraction 14 à la fraction 16.

Afin de déterminer la part de l'activité due aux HAP, une analyse des HAP a été réalisée sur cette boue. Les résultats sont présentés Tableau 43. En comparant ces résultats à la

réglementation (voir Tableau 12, p57), les concentrations des 3 trois HAP suivis sont bien inférieures à la réglementation permettant leur épandage. En effet, pour être épandues les boues doivent avoir une concentration inférieure en fluoranthène de 5 µg/g de boue sèche, en benzo(b)fluoranthène de 2,5 µg/g de boue sèche et en benzo(a)pyrène de 2 µg/g de boue sèche. Pour cette boue les concentrations en HAP sont toutes inférieures à 1 µg/g ce qui permet leur épandage.

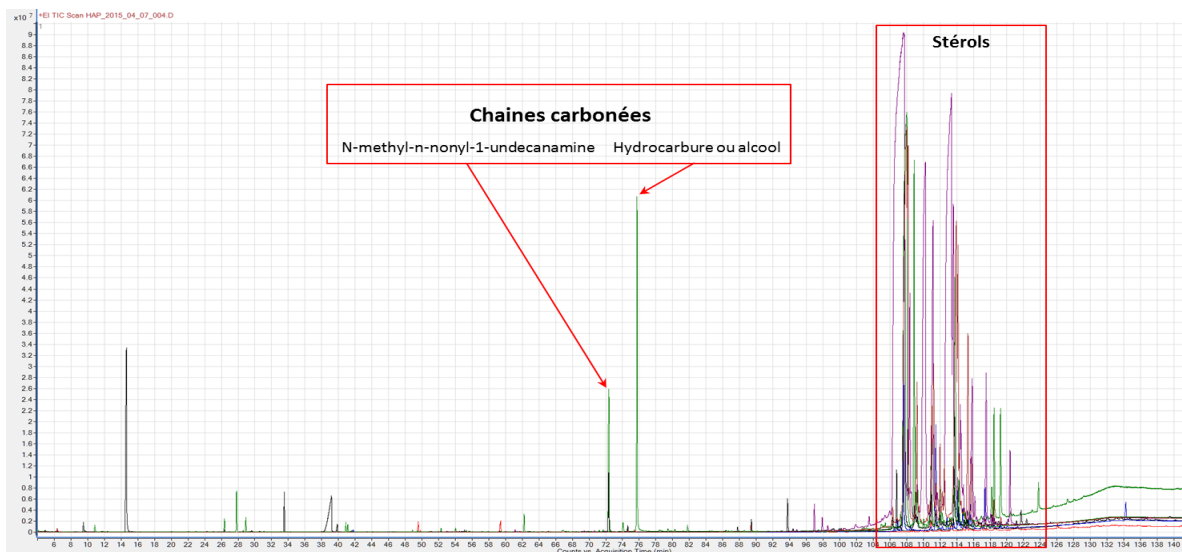
**Tableau 43** : Composition en HAP de la boue Louis Fargues (en ng/g de boue sèche). Le prélèvement a été réalisé en juin 2014.

Composé	Concentrations en (ng/g de boue sèche)	TEF basé sur le Benzo(a)pyrène
<b>Acénaphthène</b>	72	0
<b>Acénaphthylène</b>	17	5,56E-03
<b>Anthracène</b>	68	0
<b>Benz(a)anthracène</b>	478	2,58E-01
<b>Benzo (a) Pyrène</b>	406	1
<b>Benzo (b+j+k) Fluoranthène</b>	372	1.82
<b>Benzo (g, h, i) Pérylène</b>	270	0
<b>Chrysène + triphénylène</b>	484	2,92E-01
<b>Fluoranthène</b>	656	0
<b>Fluorène</b>	95	1,44E-02
<b>Indéno (1, 2, 3-cd) Pyrène</b>	267	8,43E-01
<b>Naphtalène</b>	14	0
<b>Phénanthrène</b>	542	0
<b>Pyrène</b>	609	3,58E-03
<b>Activité AhR expliquée par les HAP</b>		
<b>TEQ-chim (ng EQ-BaP/g de boue sèche)</b>		2300
<b>TEQ-bio (ng EQ-BaP/g de boue sèche)</b>		75000±12000
<b>% de l'activité AhR expliquée</b>		3±0.5

L'activité biologique expliquée par les HAP dosés reste très faible. Elle est de 3%.

## 2. Analyses non ciblées en GC-(Q)/ToF et LC-Q/ToF

Pour identifier les composés pouvant être à l'origine de l'activité AhR de cette boue, les fractions actives ont été analysées par GC/ToF et LC-Q/ToF. L'identification de composés candidats pour les activités biologiques étudiées reste très compliquée pour ce type de matrices du fait de la présence de nombreuses molécules biologiques et plus particulièrement la présence de nombreux stérols dans l'ensemble des fractions étudiées (Figure 58). Les analyses LC-Q/ToF ont également montré la complexité de ces fractions du fait de la présence de molécules biologiques telles que des stérols, des acides gras, des acides aminés et des vitamines (et leurs dérivés).



**Figure 58** : Superposition des profils chromatographiques de l'ensemble des fractions actives pour l'activité œstrogénique et AhR (fractions 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15 et 16). L'ensemble des stérols sont élués en fin de chromatographie entre 106 et 120 minutes. Les autres composés représentés sont des composés possédants des chaînes carbonées (acides gras, alcool...).

Certains composés ont tout de même été testés pour leur activité AhR du fait de leur identification en GC-Q/ToF dans les fractions 8 et 9. Il s'agit du galaxolide (n° CAS : 1222-05-5) et de la tonalide (n° CAS : 1506-02-1) qui sont tous deux des muscs de synthèse (trouvés dans la fraction 8) ainsi que le 6-méthylindole (n°CAS : 3420-02-8) retrouvé dans la fraction 9, cependant l'ensemble de ces composés n'ont pas été inducteurs de cette réponse biologique.

### 3. Conclusion de l'utilisation de la démarche sur la boue de station d'épuration

La boue de station d'épuration possède une activité œstrogénique ainsi qu'une activité AhR. Pour l'activité œstrogénique, elle est cohérente avec les activités mesurées par Vega-Morales et son équipe (Vega-Morales et al., 2013) où elles variaient de 8,6 à 238,8 ng EQ-E2/g. Cependant, il est important de noter que l'extraction complète qui englobe la matière organique n'a pas montré d'activité œstrogénique (Figure 57). Il est reconnu que ce type de composés interagisse avec la matière organique ce qui les rend non biodisponibles. Une cytotoxicité pourrait être envisagée cependant l'activité des cellules exposées à l'extrait brut présentent une activité basal équivalente aux cellules témoins quelque soit la concentration en extrait brut. Si une cytotoxicité se produisait, un effet dose-réponse s'observerait avec une diminution de l'activité basale aux plus fortes concentrations en extrait brut. A partir de cette observation, la question de la pertinence des analyses chimiques de ce type de composés après purification se pose. En effet, ces résultats tendent à montrer que ces composés sont non-biodisponibles et ne présentent pas de risques pour les organismes en contact avec cette matrice. Des investigations complémentaires seraient à réaliser afin de statuer sur cette question. Du fait de ce résultat pour cette activité biologique, les fractions des deux sols étudiés dans cette étude ont aussi été analysées. Tout comme les extraits bruts des deux sols, elles n'ont pas présenté d'activité œstrogénique.

Pour l'activité AhR, les HAP mesurés n'expliquent que 3% de l'activité biologique observée et aucun composé identifié ne permet d'expliquer l'activité observée. Or il existe des ligands

endogènes au récepteur Ah et qui induisent une activité des cytochromes P450 de type 1 comme les métabolites du tryptophane, des molécules contenant des indoles, les phényléthylamines, les tétrapyrroles (comme la bilirubine et la biliverdine), des stéroïdes (comme le 7-Ketocholestérol) et des métabolites d'acides gras (ex : prostaglandines) (Nebert et al., 2008). Les fractions étudiées sont très riches en stéroïdes, l'activité AhR observée pourrait donc être due à ces composés biologiques.

#### **4. Conclusion de l'application de l'EDA sur des matrices solides**

Cette étude a permis de confirmer l'applicabilité de l'EDA sur les matrices solides contaminées par des mélanges organiques complexes. Pour l'ensemble des trois matrices étudiées, les résultats montrent une répétabilité de méthode et son efficacité pour identifier des contaminants inconnus ou peu étudiés. Parmi les composés identifiés, 46 ont été testés pour leur activité biologique. Parmi ces composés, 24 se sont révélés actifs pour induire l'activité AhR (Annexe 2).

Ces résultats montrent que les 16 HAP de la liste de l'US-EPA ne sont responsables que d'une faible proportion de l'activité biologique observée qui est donc due à des composés non analysés lors des diagnostics environnementaux des sites pollués. Parmi les composés identifiés se trouvent :

- Des HAP (autres que les 16 de la liste de l'US-EPA)
- Des composés aromatiques polycycliques comportant des hétérocycles soufrés, azotés et oxygénés
- Des produits de dégradation de HAP : Les HAP oxydés

Pour les deux sites d'étude, les mêmes composés inducteurs d'une réponse AhR ont été identifiés signifiant que ces composés pourraient se trouver de façon ubiquiste sur les sites contaminés par des mélanges complexes. Cependant des études sur d'autres sites sont nécessaires afin de confirmer cela.

Ces résultats soulèvent la question du risque environnemental lié aux produits d'oxydation des HAP et aux N-hétérocycles qui peuvent présenter une activité AhR contrairement aux HAP possédant la même structure. Ces molécules étant plus mobiles dans le sol, elles peuvent migrer vers d'autres compartiments tel le milieu aquatique et être à l'origine de propagation de la contamination.

Toutefois, l'ensemble de l'activité biologique des matrices n'a pas pu être entièrement expliqué du fait de la complexité des mélanges étudiés et plus particulièrement de la limitation de l'étape de confirmation due à l'absence ou au prix des composés purs sur le marché (Annexe 4).

De manière plus générale, ces travaux ont permis d'identifier des contaminants sur lesquels il faudra réaliser des études toxicologiques afin de statuer sur l'ensemble de leurs effets toxiques. Cette démarche est un premier pas dans l'amélioration des diagnostics et de l'évaluation du risque environnemental liés aux sols pollués.



## **Discussion générale**

Dans cette discussion, les différents éléments abordés concernent les approches employées et les limitations concernant les différentes étapes de l'EDA ainsi qu'une discussion sur les molécules identifiées lors de ce travail. Cette discussion inclut les différentes perspectives possibles pour améliorer la démarche ainsi que des pistes de travail afin d'aller vers une meilleure analyse du risque chimique associé aux sols pollués.

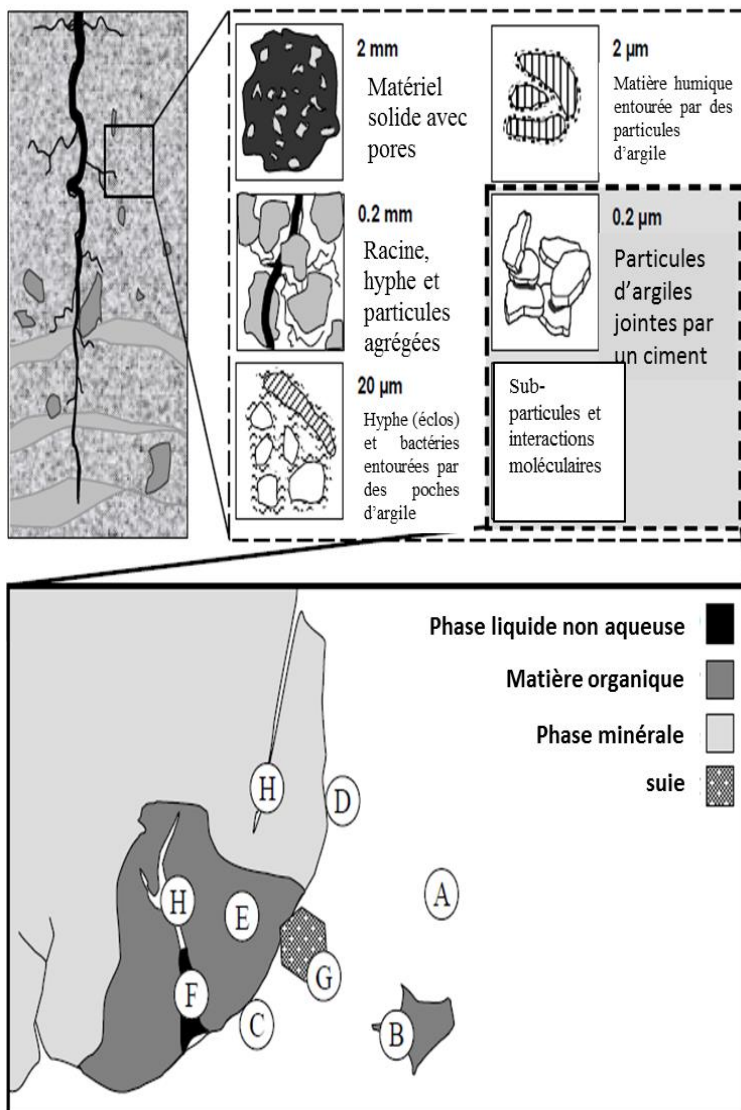
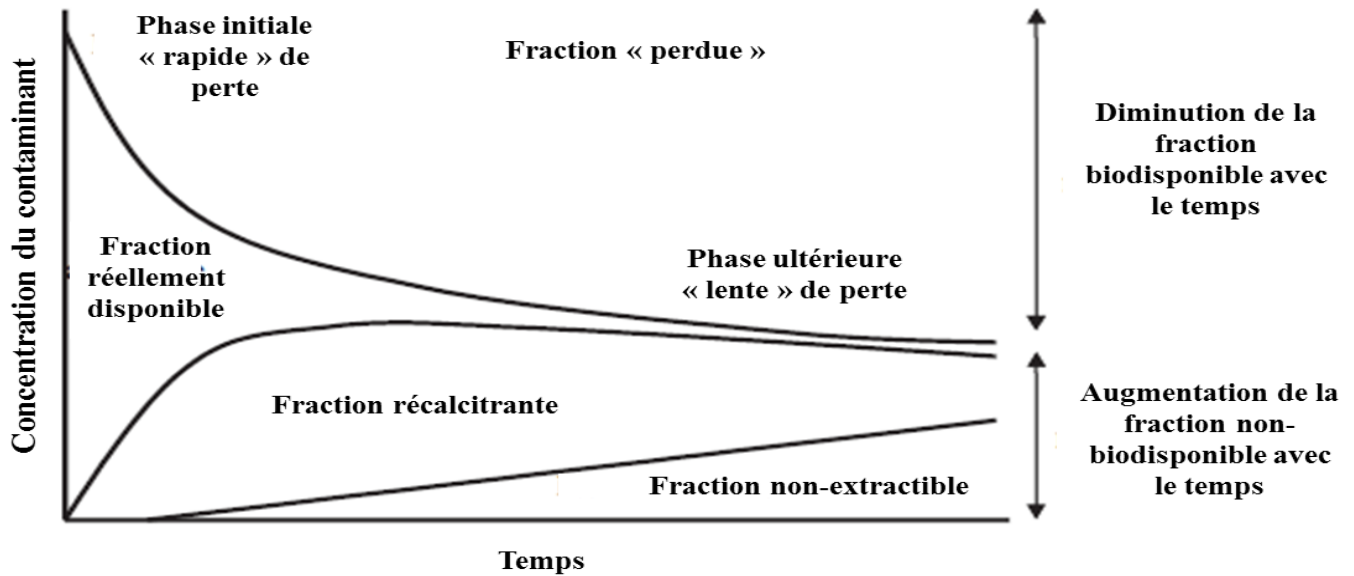
## **I. L'EDA et ses différentes étapes**

La démarche développée dans cette thèse a montré son potentiel dans l'identification de contaminants présents dans les sols industriels. Cependant comme toute analyse, elle présente des points forts et des faiblesses dont il faut avoir conscience ainsi que des pistes d'amélioration afin de l'appliquer aux sols pollués.

### **1. L'extraction des composés : Vers une prise en compte de la bioaccessibilité ?**

L'extraction est une étape clef de toute analyse chimique, elle l'est encore plus en EDA du fait du travail cherchant à mettre en évidence des composés inconnus. Elle doit être complète afin d'extraire un maximum de composés. Cependant, ce type d'extraction peut être remis en question du fait de la disponibilité des contaminants des sols. La disponibilité des contaminants correspond au fait que le contaminant puisse entrer en interaction avec les êtres vivants (bactéries, animaux ou végétaux), pénétrer dans les organismes afin d'atteindre les cibles biologiques et entraîner notamment des effets délétères. Cette notion englobe la bioaccessibilité et la biodisponibilité (Figure 60). Cependant, une fois dans le sol, les contaminants entrent en interaction avec les différentes phases du sol (phase gazeuse, liquide et solide) ce qui va entraîner leur piégeage et une diminution de la biodisponibilité des contaminants au cours du temps (Figure 59). Il en découle une surestimation du risque basée sur les analyses chimiques du fait de l'extraction complète des contaminants qu'ils soient disponibles ou non. Il en est de même pour l'EDA où l'extraction forte permet en effet d'accéder à une large gamme de contaminants présents dans les sols étudiés mais qui inclut également l'analyse de composés n'étant pas forcément biodisponibles. Une piste d'amélioration dans l'utilisation de l'EDA est l'utilisation d'une extraction plus « douce » afin d'accéder uniquement aux contaminants biodisponibles. Cui et al., (2013) ainsi que Cachada et al., (2014) ont fait un bilan des méthodes d'extraction afin d'analyser uniquement les contaminants biodisponibles. Parmi les méthodes employées, les plus connues sont les extractions douces par solvant (Kelsey et al., 1997; Liste et Alexander, 2002), par cyclodextrines (Reid et al., 2000 ;Cuypers et al., 2002) ou par des extractions Tenax (Cornelissen et al., 1997; Cornelissen et al., 2001 ;Xu et al., 2008). Des méthodes impliquant également des échantillonneurs passifs ont également été développées comme les dispositifs à membranes semi-perméables (DMSP), le dispositif utilisant du polyéthylène (DPE), l'échantillonneur utilisant du Polyoxyméthylène (POM) ou encore l'utilisation de micro-films tel que l'éthylène vinyl acetate (EVA). Enfin une dernière méthode est l'utilisation de la microextraction en phase solide (SPME).

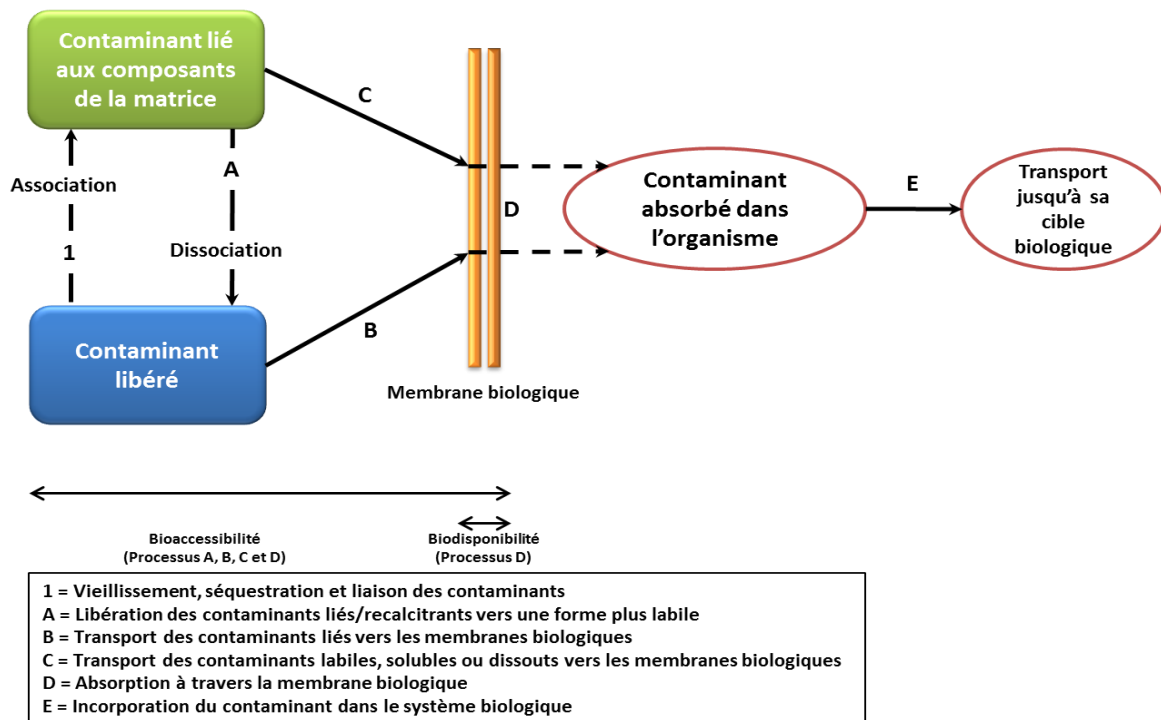
Cependant les mesures de biodisponibilité sont encore à l'étude et nécessitent de travailler sur des composés spécifiques (comme les 16 HAP de la liste de l'US-EPA) afin de comparer les résultats avec des bioessais et de confirmer l'efficacité des méthodes dans l'évaluation de la biodisponibilité des contaminants (Cui et al., 2013). Malgré tout, une des perspectives de travail serait d'étudier le couplage de ces différents types d'extraction ou d'échantillonnage avec une analyse EDA afin de prendre en compte uniquement les contaminants biodisponibles et ainsi évaluer au mieux le risque environnemental lié à la contamination chimique des sols.



**Figure 59 :** En haut, diagramme représentant l'évolution de la biodisponibilité des contaminants au cours du temps.

A gauche, modèle conceptuel du sol incluant 6 perspectives (de 2 mm aux interactions moléculaires) et leur contribution à la structure du sol. Les différents compartiments au niveau particulaire (en bas à gauche) incluent la phase minérale, différentes formes de matière organique, des résidus de carbone comme de la suie et de la phase liquide non-aqueuse (PLNA). Les lettres indiquent les différentes interactions possibles entre les contaminants et les différents compartiments du niveau particulaire : A = Solubilisation dans la phase aqueuse; B = Adsorption sur ou dans la matière organique dissoute; C = Adsorption à la surface de la matière organique; D = Adsorption sur les matière minérale; E = Adsorption dans la matière organique dense; F = Adsorption sur du carbone d'origine anthropique incluant la PLNA; G = Adsorption sur la suie ou des structures de carbone similaire et H = piégeage dans des micro pores.

*Sources :* Bergknut. (2006) et Riding et al. (2013)



**Figure 60 :** Représentation de la bioaccessibilité et de la biodisponibilité des contaminants présents dans le sol. Cette Figure est adaptée des travaux de Riding et al. (2013) et de Semple et al. (2007)

## 2. Le fractionnement

Le fractionnement employé dans cette étude a montré son efficacité en permettant une séparation suffisante des contaminants en fonction de leur polarité et en limitant la perte des composés lors de cette étape de traitement des échantillons. Les sols étudiés sont essentiellement composés de HAP qui éluent dans les fractions 7 et 8, ce qui complexifie l'identification des composés biologiquement actifs dans ces deux fractions. Il serait envisageable de rajouter une étape de fractionnement pour ces deux fractions grâce à des critères d'aromaticité séparant les composés en fonction de leur nombre de cycles benzéniques comme cela a déjà été employé dans une étude EDA (Sundberg et al., 2006). De plus, le fractionnement en EDA tend également vers une automatisation et une multiplication des fractions simplifiant ainsi la démarche et le travail sur l'identification

## 3. Les bioessais : Limites et avantages

L'utilisation des bioessais est l'élément qui conditionne les composés qui vont être identifiés. En effet, l'extraction peut être la plus exhaustive possible et le processus de fractionnement le moins à l'origine de perte, seuls les bioessais permettent d'identifier les composés responsables d'activités biologiques spécifiques. Si les bioessais employés ne sont pas en adéquation avec le type de contamination de la matrice étudiée, l'EDA ne permettra pas l'identification de molécules et perd ainsi tout son intérêt. Malgré tout, l'utilisation de bioessais impliquant des réponses biologiques spécifiques est nécessaire afin de simplifier l'identification de composés inconnus car l'utilisation de bioessais impliquant des organismes complets complexifie l'identification des composés toxiques du fait de la non-spécificité de mécanismes d'action. De plus l'utilisation d'organismes complets impliquent comme cela été abordé dans le matériel et méthode (3.1. les outils in vivo, p78) une logistique plus importante. Le bioessais impliquant le récepteur Ah ainsi que la mesure de l'activité EROD est dans ces cas d'études intéressant vu le type de contamination des sites. Cependant,

L'utilisation d'un panel de bioessais serait pertinent afin d'identifier un ensemble de composés actifs selon plusieurs mode d'action. Un bioessai intéressant à appliquer sur les sites étudiés serait celui impliquant le suppresseur de tumeur P53. Le P53 joue un rôle important dans le cycle cellulaire et dans la réparation des dommages à l'ADN (El-Deire et al., 1992 ; Levine, 1997 ; Nakayama, 2004). Ohno et son équipe (Ohno et al., 2005, 2008) ont développé une test cellulaire impliquant le gène de la luciférase sous le contrôle du promoteur du gène p53R2 dans la lignée cellulaire MCF-7. Ce bioessais, peut être utilisés, avec ou sans S9 (ensemble enzymatique hépatique) et permet d'identifier les composés génotoxiques avec ou sans métabolisation. Ce test a montré une très bonne sensibilité et spécificité dans l'identification de composés génotoxiques et cancérigènes chez l'humain.

L'utilisation de trois bioessais incluant le test AhR, le P53 ainsi qu'un test de toxicité aigüe comme le microtox serait une base dans l'identification de composés à activité biologique. En comparant les profils d'activité biologiques des fractions entre ces trois bioessais, il serait possible de vérifier l'adéquation de l'ensemble des activités biologiques observées et ainsi identifier l'ensemble des contaminants pouvant présenter un risque pour l'environnement. L'idéal étant tout de même de pouvoir réaliser le maximum de bioessais afin d'identifier l'ensemble des composés pouvant présenter un risque environneman et sanitaire.

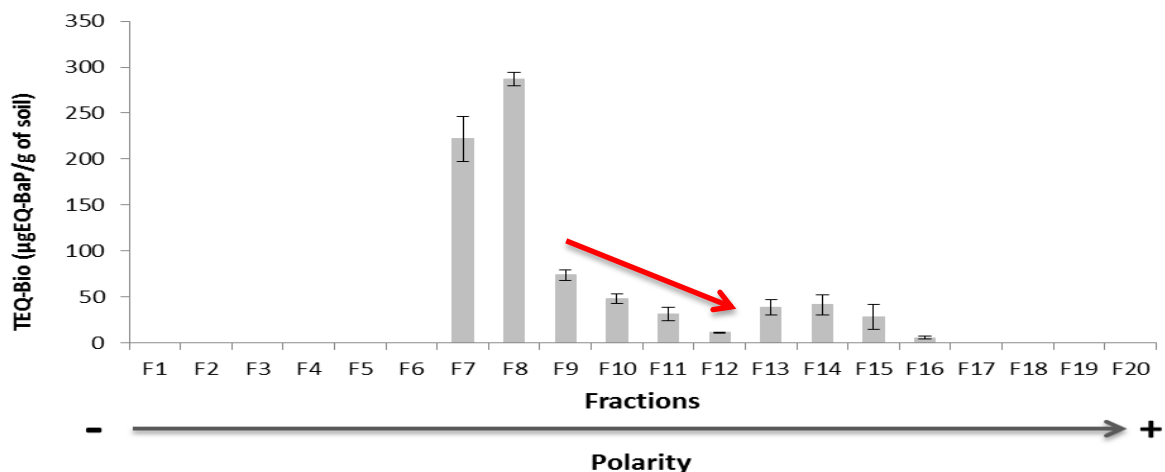
#### **4. L'identification de composés : une analyse complexe**

L'identification des composés candidats pour expliquer l'activité biologique reste l'étape la plus complexe de l'EDA. Elle nécessite de mettre en place plusieurs stratégies afin d'identifier des composés actifs et de réaliser une étude intégrée des résultats. Pour cela, il est important :

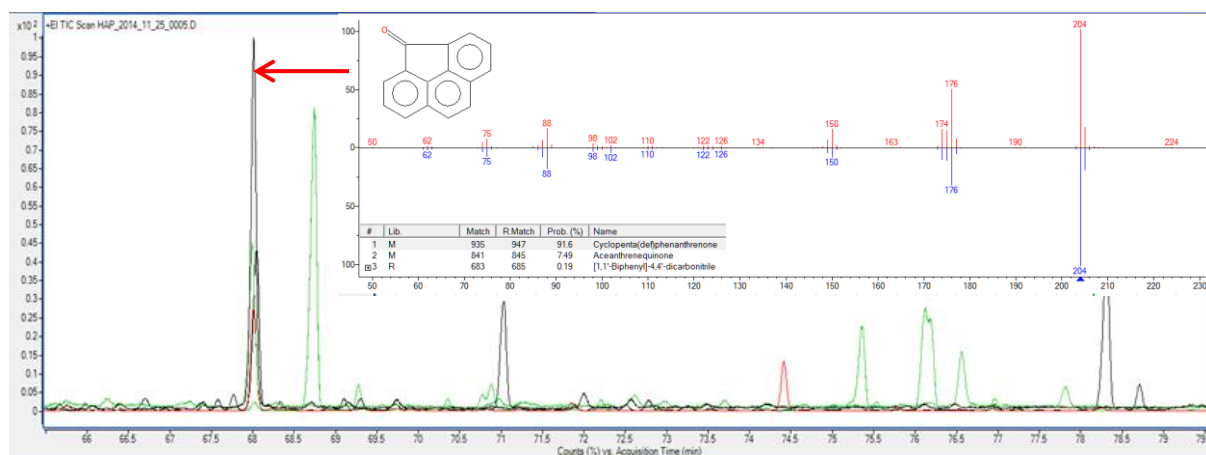
- ✓ D'étudier les profils de fractionnement des sols, des chromatogrammes des fractions et de les comparer les uns par rapport aux autres.

#### Exemple de la cyclopenta(def)phénanthrène :

L'identification de la cyclopenta(def)phénanthrène a pu être réalisée en étudiant le profil de l'activité biologique des fractions du sol P9. En effet, en étudiant ce profil, une décroissance de l'activité AhR a été observée entre les fractions 9 et 12 (Figure 61). En superposant les profils chromatographiques de ces fractions, un pic est en commun entre elles avec une atténuation du signal. Il s'agit du signal de la cyclopenta(def)phenanthrene (Figure 62). Ces résultats ont pu être confirmés par l'injection de cette molécule en HPLC et l'observation d'une traine suivant le pic d'éluion de cette molécules et le dosage de cette molécules par GC/MS (Article 1 : Application of effect-directed analysis to identify organic pollutants in industrial soil polluted by creosote). Bien que cet effet de traine ne soit pas explicable et que cette molécule n'explique pas l'ensemble des activités des fractions où elle a été identifiée, la traine a permis de l'identifier comme inducteur de la réponse AhR.



**Figure 61** : profil d'activité AhR des fractions du sol P9. La flèche en rouge correspond à la décroissance progressive de l'activité AhR observée entre les fractions.

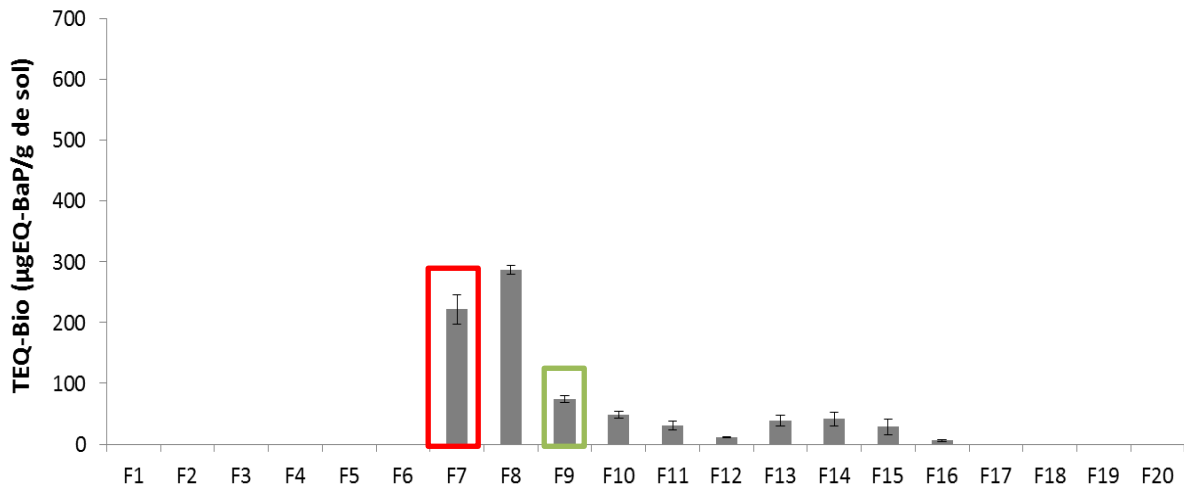


**Figure 62** : Superposition des chromatogrammes des fractions 9-12. Ces fractions ont un composé en commun qui est la cyclopenta(def)phenanthrene.

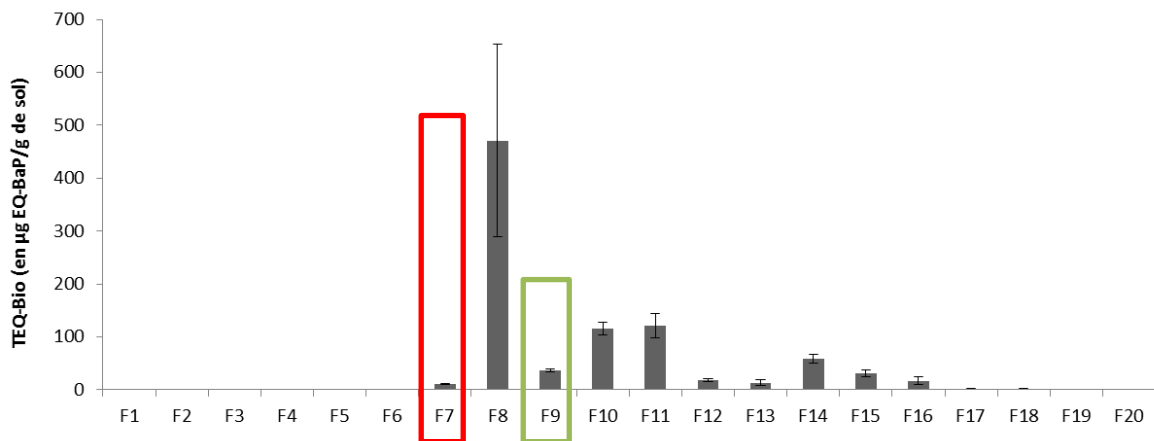
### Comparaison des profils de sols :

En comparant les profils de fractionnement des deux sols, les fractions 7 et 9 du sol P9 sont relativement plus actives que celles du sol 168 par rapport à la fraction 8 qui est la plus active (Figure 63). En étudiant, les chromatogrammes de la fraction 7 des deux sols (Figure 64), la différence d'activité s'explique majoritairement par une différence qualitative (avec la présence de plus de composés dans la fraction 7 du sol P9) que par une différence quantitative (signaux de même intensité). Ce qui est confirmé avec le dosage des HAP où les HAP inducteurs sont à des concentrations équivalente entre les deux sol. Par exemple, la concentration en benzo(a)pyrène est de 16,9 µg/g de sol sec dans le sol 168 et de 9,2 µg/g de sol sec dans le sol P9. Il est à noter que dans la figure 63, une saturation de signal est observable pour le phénanthrène, le pyrène et le fluoranthène pour le sol P9 du fait des fortes concentrations de ces composés dans la créosote.

### Activité Ah des fractions du sol P9 du site A

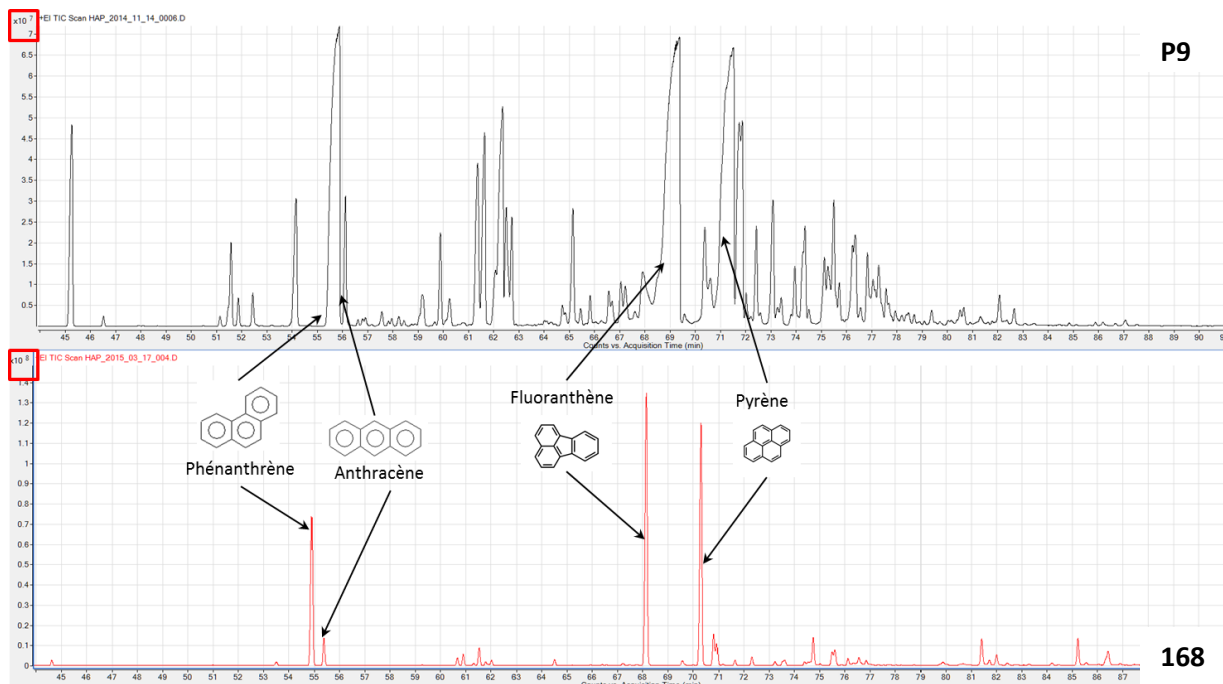


### Activité Ah des fractions du sol 168 du site C

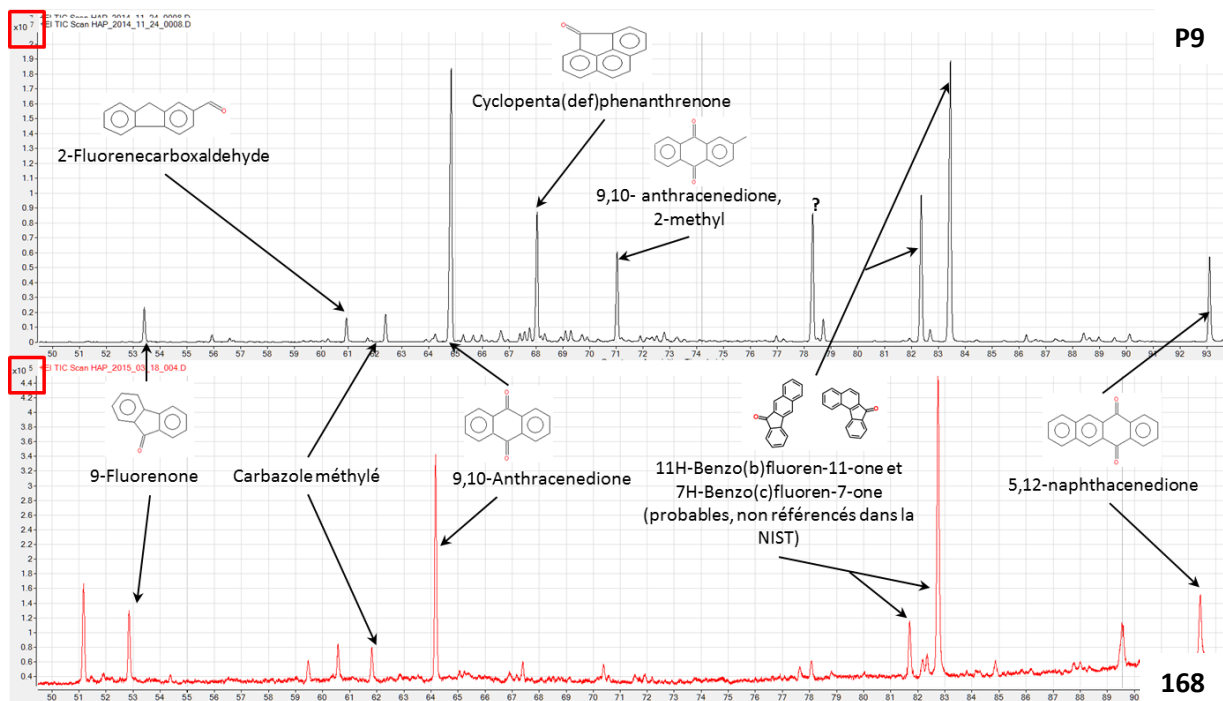


**Figure 63** : Profil de l'activité AhR des fractions des deux sols étudiés lors de ces travaux. Encadrés en rouge, les fractions 7 des deux sols avec une différence d'activité de cette fraction entre les deux sols. De même, la fraction 9 (encadrée en vert) du sol P9 est relativement très active comparée à celle du sol 168.

Alors qu'en comparant les fractions 9 des deux sols, ce sont majoritairement les mêmes molécules qui sont représentées (Figure 65). La différence réside dans la quantité de composés présents. En effet, l'intensité du signal est de  $10^7$  pour le sol P9 et de  $10^5$  pour le sol 168. Etant donné que l'analyse EDA de ces sols a été réalisée sur 0,1g du sol P9 et 0,5g sur le sol 168, ceci indique que les oxy-HAP présents dans cette fraction sont moins abondants dans le sol 168 que dans le sol P9, et que la différence d'activité biologique peut s'expliquer par une différence de concentrations des composés présents plutôt que par une différence qualitative (présence de molécules différentes).



**Figure 64** : Comparaison des chromatogrammes des fractions 7 des deux sols étudiés (P9 et 168). Encadré en rouge, l'échelle d'intensité du signal qui est de  $10^7$  et de  $10^8$  pour le sol P9 et 168 respectivement. Les signaux correspondant au phénanthrène, à l'anthracène au fluoranthène et au pyrène (composants principaux de la créosote) sont indiqués.



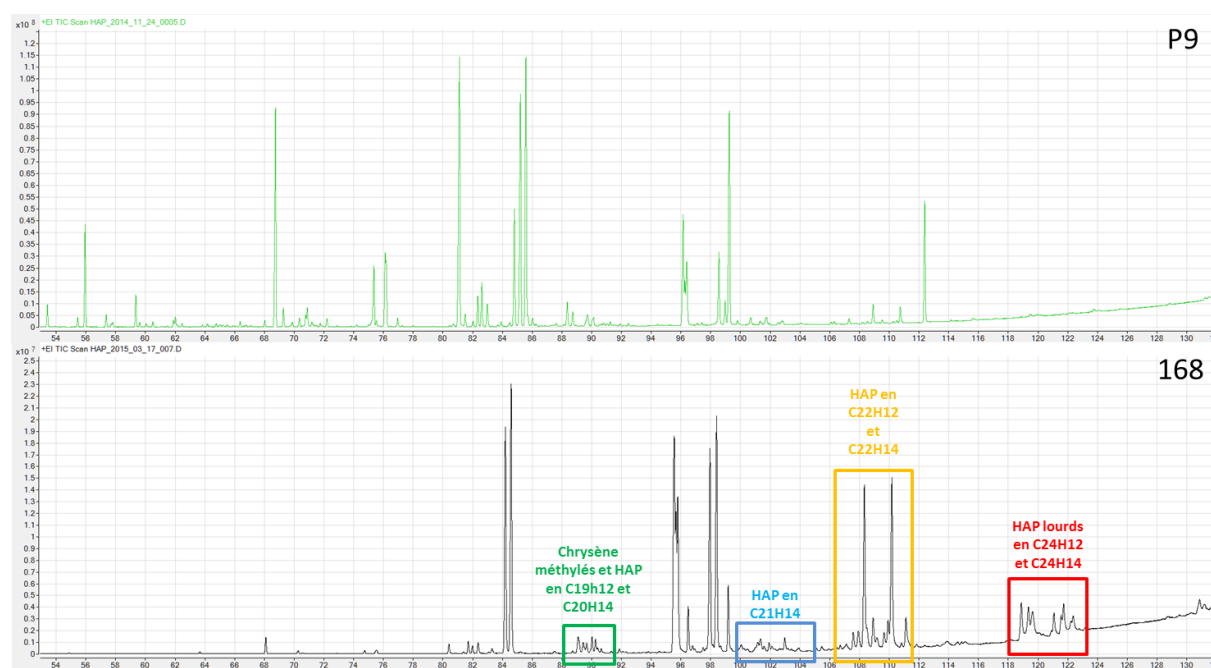
**Figure 65** : Comparaison des chromatogrammes des fractions 9 des deux sols étudiés (P9 et 168). Encadré en rouge, l'échelle d'intensité du signal qui est de  $10^7$  et de  $10^5$  pour le sol P9 et 168 respectivement. Les molécules correspondant aux signaux les plus intenses sont également représentées.



✓ D'utiliser l'analyse d'équilibre des masses

L'étude d'équilibre des masses apporte également une information non négligeable. En effet, en comparant les profils d'activité AhR des fractions des deux sols, la fraction 8 présente une très forte activité pour les deux sols. Cependant en utilisant la MBA basée sur les 16 HAP de la liste de l'US-EPA, ces derniers n'expliquent que 21% de l'activité AhR observée pour la fraction 8 du sol 168 contrairement au sol P9 où 60% de l'activité de cette fraction est expliquée par ces composés.

L'activité AhR observée pour la fraction 8 du sol 168 est donc générée par d'autres composés présents. Une comparaison des chromatogrammes de cette fraction pour les deux sols révèle des différences qualitatives (Figure 66). Ainsi, ce sol possède des HAP méthylés du chrysène (C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>) et du benzo(a)pyrène (C<sub>21</sub>H<sub>14</sub>) dont les formes non méthylés sont reconnus comme inducteurs de la réponse AhR (Louiz et al., 2008) ainsi que leur formes méthylées (Cheung et al., 1993). De même, trois pics chromatographiques correspondent à des molécules en C<sub>19</sub>H<sub>12</sub>. En recherchant dans Chemspider les composés correspondants à cette formule brute, 10 résultats ressortent dont le 4H-Cyclopenta[def]chrysène (202-98-2) et 11H-Cyclopenta[pqr]tétraphène (202-94-8), deux molécules aux structures très proches du benzo(a)pyrène pouvant potentiellement induire une réponse AhR. En ce qui concerne les molécules en C<sub>20</sub>H<sub>14</sub> et en C<sub>21</sub>H<sub>14</sub> (autre que les benzo(a)pyrènes méthylés), les molécules identifiées par la NIST (une bibliothèque de spectres de masses de molécules) correspondent à des composés aux structures proches des trois HAP inducteurs de la réponse AhR suivant : 7H-Benzo(c)fluorène, 11H-Benzo(a)fluorène et 11H-Benzo(b)fluorène. Ces composés ont été présentés dans l'article 2 (Identification of AhR-ligands by an effect directed analysis approach in a contaminated soil of a gas treatment plant). Enfin des HAP plus lourds composés de 22 à 24 carbones sont également présents dont certains ont montré leur fort potentiel à induire l'activité biologique étudiée pour ce sol (ex : Dibenzo(a,i)pyrène et Dibenzo(a,h)pyrène). Des investigations supplémentaires sur l'ensemble de ces molécules sont nécessaires afin de mieux expliquer l'activité AhR de ce sol.



**Figure 66** : Comparaison des chromatogrammes des fractions 8 des deux sols étudiés (P9 et 168). Les pics chromatographiques encadrés correspondent aux molécules présentes dans le

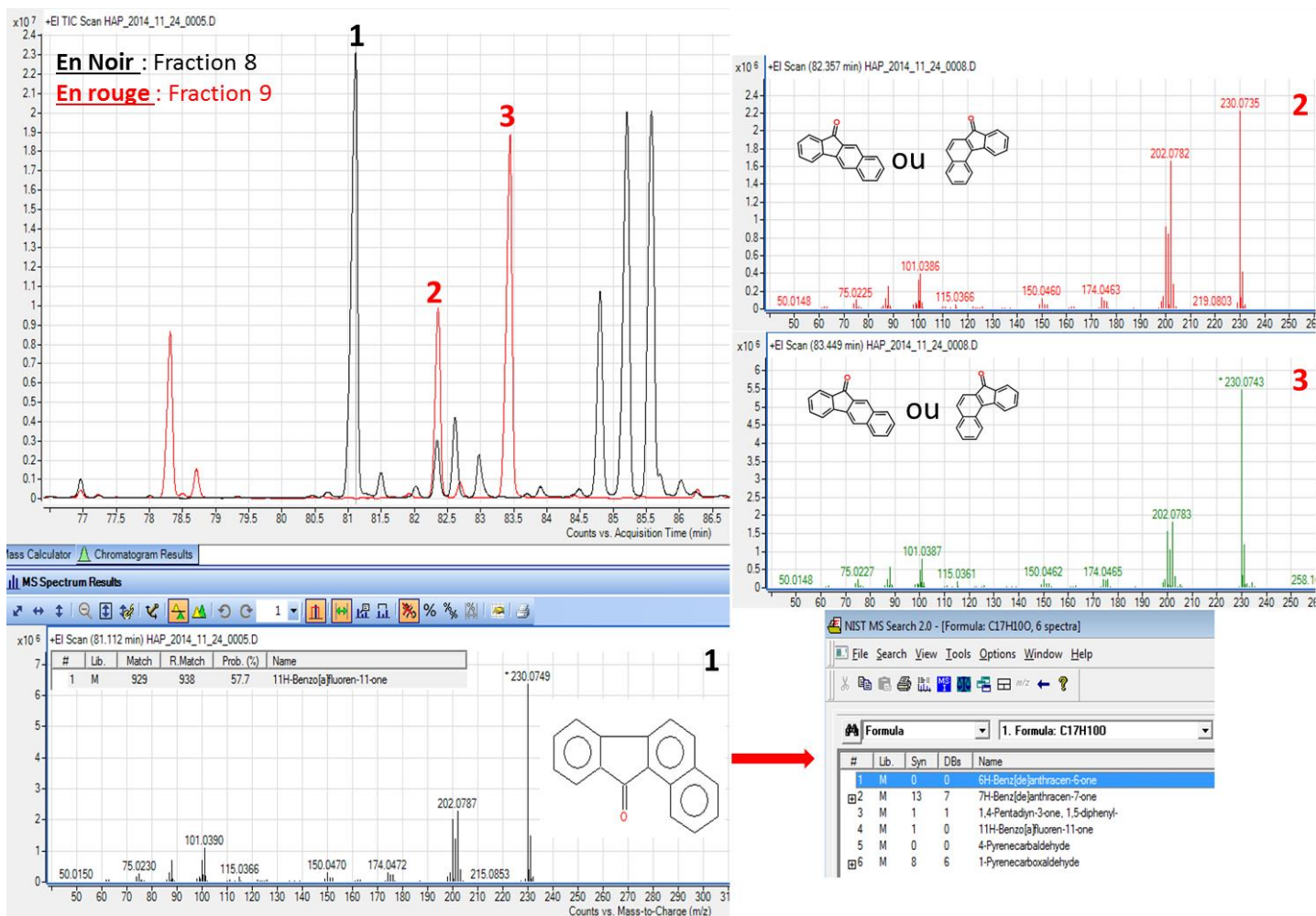
sol 168 et absentes du sol P9.

- ✓ De comparer les structures des molécules :

En effet, pour que des composés puissent interagir avec un récepteur cellulaire, il est nécessaire qu'ils possèdent des caractéristiques structurales spécifiques afin d'entrer dans le site actif du récepteur Ah et d'entraîner la cascade de signalisation permettant de mesurer l'activité EROD. C'est pour cela que plusieurs molécules sont suspectées comme potentiellement inductrices de la réponse AhR sans pour autant avoir leur activité confirmée.

**Remarque :**

Il faut également être conscient que les bases de données ne sont pas exhaustives et que des molécules candidates peuvent ne pas être référencées. Par exemple, la 11H-benzo(a)fluorene-11-one a été identifiée comme inducteur de la réponse AhR et sa présence confirmée dans la fraction 8 (Figure 67) par un dosage en chromatographie gazeuse (correspondance au niveau du temps de rétention) et par HPLC. Cependant les sols étudiés contiennent également du 11H-Benzo(b)fluorène et du 7H-benzo(c)fluorène dont les produits d'oxydation ne sont pas référencés dans la base de données de molécules de la NIST. Or ces différents composés sont des isomères dont les spectres de masse sont similaires. Des spectres de masse identiques à celui de la 11H-benzo(a)fluorene-11-one correspondent à deux pics chromatographiques de la fraction 9. Ces pics sont probablement ceux des produits d'oxydation du 11H-Benzo(b)fluorène et du 7H-benzo(c)fluorène : le 7H-Benzo[c]fluorene-7-one et le 11H-Benzo[b]fluorene-11-one. Leur présence ainsi que leur activité biologique doivent maintenant être confirmées.

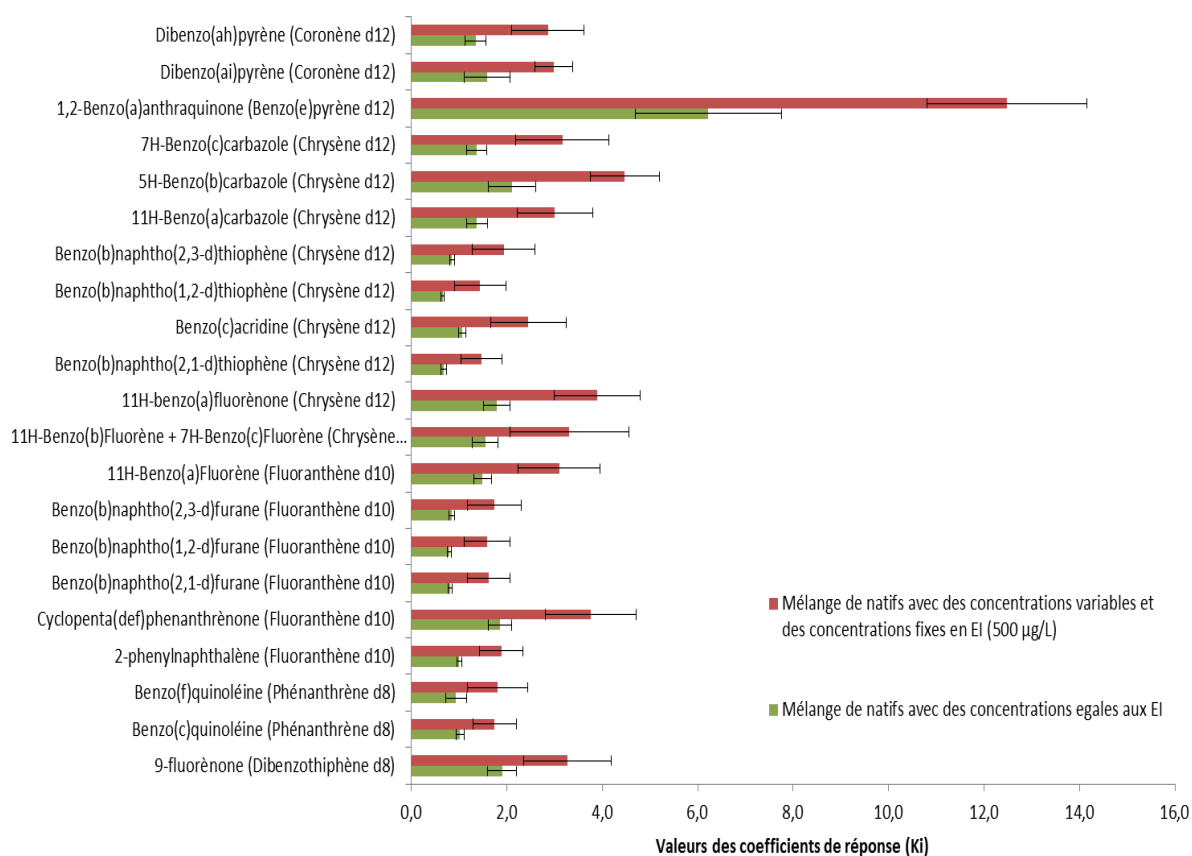


**Figure 67** : Chromatogrammes des fractions 8 (en noir) et 9 (en rouge) du sol P9 du site de creosotage. 1 : Pic chromatographique du 11H-benzo(a)fluorène-11-one dont la présence a été confirmée dans la fraction 8 grâce à un dosage en chromatographie gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse et qui est référencé dans la base de données moléculaires de la NIST. 2 et 3 : Pics chromatographiques de deux composés ayant un spectre de masse identique à celui de la 11H-benzo(a)fluorène-11-one. Il s'agit probablement de la 7H-Benzo[c]fluorène-7-one et de la 11H-Benzo[b]fluorène-11-one, deux composés qui ne sont pas référencés dans la base de données de la NIST.

### 5. Confirmation : L'étape limitante de l'analyse dirigée par les effets

La confirmation en EDA est l'étape limitante pour plusieurs raisons. La première est liée aux prix des composés qui restent encore très élevés (annexe 4) ou à l'absence des composés identifiés dans le commerce. Ceci entraîne des complications de dosage des composés par des méthodes chromatographiques. Dans cette étude, une méthode d'analyse par GC/MS a été développée pour les 24 molécules reconnues pour être inductrices de l'activité AhR (Annexe 5). Pour ce dosage, la méthode initialement choisie a été l'utilisation d'un étalonnage interne grâce à des HAP deutérés. Cependant les composés identifiés dans cette étude ont montrés des variations dans les coefficients de réponse ( $K_i$ ) associés aux HAP deutérés en fonction des concentrations des molécules à doser (Figure 68), entraînant une erreur importante dans les concentrations estimées. Cette variation est due à des différences de comportement chimique des composés par rapport aux étalons de quantification qui se sont révélés inappropriés. C'est pourquoi, un étalonnage externe a été employé. Ces difficultés de dosage sont également liées à l'absence de standards dans le commerce. En effet, les standards des composés identifiés

sont peu étudiés à l'heure actuelle et par conséquent, les étalons de quantification associés à ces composés sont rares également.



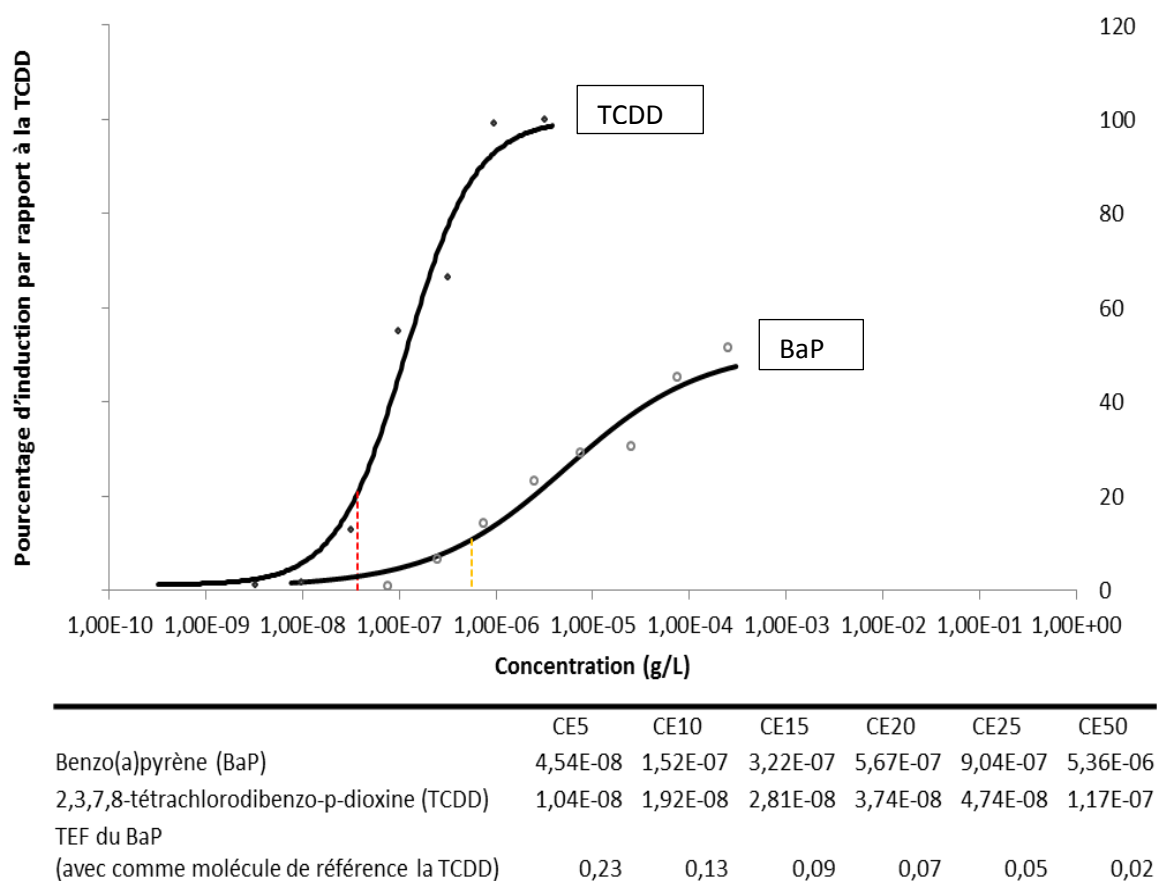
**Figure 68** : Coefficient de réponse des composés développés en GC/MS par rapport aux étalons de quantification utilisés (composés entre parenthèses). Les concentrations testées de natifs ont été de 5, 50, 100, 500, 1000 µg/L (1µl injecté). En rouge, les coefficients de réponse ont été déterminés avec une concentration en étalon de quantification fixée à 500 µg/L. En vert, la quantité d'étalon de quantification suivait celle des composés à doser.

De même, l'absence de standards dans le commerce limite la confirmation d'activité biologique des molécules identifiées. Une des solutions face à cela serait l'utilisation de la bio-informatique et plus particulièrement de méthode de docking afin d'évaluer *in silico* si les composés identifiés peuvent interagir avec le récepteur Ah. Cependant en consultant la Protein Data Bank (PDB), aucune structure complète du récepteur Ah n'a été trouvée. Une tentative afin d'expliquer les différences de cinétiques entre le 7H-Benzo(c)fluorène, le 11H-Benzo(a)fluorène, le 11H-Benzo(b)fluorène ainsi que leurs analogues comportant des S-,N-,O-hétérocycles basé sur un modèle créé par Motto et al., (2011) et utilisé par Nathalie Geneste s'est révélée infructueuse. Il serait intéressant d'obtenir la structure cristallographique de ce récepteur afin d'ajouter une étape de modélisation d'interaction des composés avec le récepteur Ah. Ceci permettrait de limiter les achats de standards qu'aux molécules dont le potentiel d'induction a été montré *in silico*.

La dernière difficulté dans la confirmation de l'EDA est associée à l'utilisation des TEF. Les expériences montrent bien que l'additivité des effets est respectée. Cependant les composés ont des cinétiques différentes les uns par rapport aux autres entraînant une variation des TEF en fonction de la concentration des composés. La Figure 69 illustre ce phénomène en

déterminant les TEF du benzo(a)pyrène à partir de la TCDD. En fonction de la concentration efficace utilisée (5, 10, 15, 20 ou 50% d'induction par rapport au témoin positif), la TEF du BaP varie de 0,02 à 0,23. De plus, les inducteurs de la réponse AhR présentent une induction sous forme de cloche (Fent, 2001). Or, dans un extrait les composés sont présents en mélange à des niveaux variables ; des composés seront dans les concentrations au niveau de la phase d'induction, d'autres de la phase plateau et d'autre sur la phase décroissante de la réponse AhR. Il en découle une surestimation ou une sous-estimation de l'activité biologique théorique de mélanges des composés inducteurs. Afin de pallier ce problème, il serait préférable de recréer le mélange des composés actifs identifiés aux concentrations trouvées dans la fraction et de le tester en parallèle de la fraction afin de comparer leur TEQ-bio dans les mêmes conditions et ainsi éviter l'erreur due au modèle additif impliquant les TEF.

Malgré tout, l'utilisation du modèle utilisant les TEF reste un outil intéressant pour comparer des activités biologiques d'extraits à partir d'analyses chimiques. Cela permet de sélectionner sur un ensemble d'échantillons le sol le plus pertinent à fractionner pour une analyse dirigée par les effets.



**Figure 69** : Induction de l'activité AhR du benzo(a)pyrène et de la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine chez les cellules PLHC-1 après 4h d'exposition. Les EC des deux composés sont également présentées ainsi que la TEF du BaP en fonction de l'utilisation de différences concentrations efficaces (EC)

## 6. Conclusion sur l'EDA

La démarche a montré son potentiel dans l'identification de contaminants inconnus. Malgré tout, plusieurs freins existent. Le premier est la complexité de l'identification des composés qui demandent un couplage des données et une analyse approfondie des résultats. La deuxième est la confirmation des contaminants du fait de l'absence de standards dans le commerce et/ou de leurs coûts.

Cependant, cette démarche est auto-apprenante et s'enrichit au fur et à mesure des données collectées. En effet une fois un composé identifié, il peut être incorporé dans les analyses chimiques initiales et ainsi sa part dans l'activité biologique observée estimée. Il en découle une simplification de l'EDA au fur et à mesure de son utilisation sur des sites industriels. De plus, la méthodologie semble généralisable, ce qui permettrait d'obtenir des profils d'activité biologiques pour les sols étudiés et de les comparer entre eux aidant ainsi à l'identification de composés à activité biologique.

Toutefois, il faut avoir conscience que l'EDA ne remplace pas une étude toxicologique réalisée sur un composé. Elle met en évidence des composés ayant une activité biologique cependant ceci ne permet pas de statuer sur la toxicité d'un composé qui nécessite des études d'expositions aiguës et chroniques sur des organismes entiers afin de prendre en compte l'ensemble des effets que ces molécules pourraient avoir. De plus ces études prennent en compte l'ensemble des processus d'absorption, de distribution, de métabolisation et d'excrétion (ADME) qui ne peuvent être évalués avec les outils employés dans ces travaux.

Le principe de précaution incite malgré tout à incorporer les composés actifs identifiés dans les diagnostics des sols industriels afin de mieux caractériser la contamination des sols que ce soit d'un point de vu quantitatif que qualitatif.

## II. Discussion sur les composés analysés et perspectives d'études scientifiques

Parmi les composés identifiés figurent des HAP mais également des CAP comportant des N-,S-,O-hétérocycles. Comme cela a été précisé, nombre de ces composés ont été très peu étudiés vis-à-vis de leurs effets toxiques et de leur comportement dans l'environnement. L'ensemble de ces composés demanderaient à être plus étudiés. L'une des prochaines étapes dans l'étude des sites pollués serait l'analyse des eaux souterraines situées sous les sites pollués par des analyses chimiques ciblées sur les composés identifiés dans ces travaux et par une approche EDA. En effet, des composés plus polaires que les HAP ont été identifiés et sont plus à même de migrer dans les eaux souterraines. Ils pourraient être à l'origine d'une pollution non prise en compte dans les diagnostics actuels des sites contaminés. De plus, l'EDA appliquée à ces eaux pourrait mettre en avant des contaminants non identifiés dans les sols industriels ici étudiés.

Une autre piste d'étude est le suivi temporel de l'activité biologique et des concentrations des composés ici identifiés lors de la rémediation d'un site pollué. L'application de l'EDA afin de mieux caractériser l'état de contamination chimique et du potentiel toxique d'un sol lors de ces processus de traitement serait aussi intéressant dans le cas d'une augmentation des activités biologiques associées à une diminution de concentration de composés inducteurs afin d'identifier des produits de dégradation responsables des réponses biologiques observées.

## **Conclusion générale**

La gestion de la pollution des sols apparaît aujourd'hui un enjeu majeur compte tenu des risques sanitaires, techniques, économiques et juridiques pour les industriels. Cette gestion des sites et sols pollués nécessite la mise en œuvre de diagnostics qui doivent permettre d'appréhender l'état de pollutions des milieux. Le travail de cette thèse s'inscrit dans ce contexte de gestion à travers la mise en place d'une approche bio-analytique de type EDA permettant l'identification de molécules biologiquement actives présentes dans les sols et ainsi d'améliorer la caractérisation de la contamination des sols par des polluants organiques.

Ce travail a permis :

- 1) De mettre en place une méthode afin d'identifier des polluants présents dans des sols industriels pollués interagissant avec le récepteur Ah à travers l'utilisation d'outils *in vitro*.
- 2) D'identifier de nouvelles molécules d'intérêt présentes dans des mélanges de contamination complexe à incorporer dans les diagnostics environnementaux des sites et sols contaminés.
- 3) De confirmer l'efficacité de la méthode grâce à une approche multi-sites.

L'ensemble de ces résultats montrent l'intérêt de l'analyse dirigée par l'effet afin d'améliorer les diagnostics des sols pollués qui se basent à l'heure actuelle uniquement sur des analyses chimiques ciblées. La bioanalyse permet en effet l'identification de polluants émergents comme les produits d'oxydation des HAP, des composés aromatiques polycycliques comportant des hétérocycles et des hydrocarbures aromatiques polycycliques qui ne font pas encore parti des diagnostics environnementaux des sols contaminés. Cette approche soulève également la question du vieillissement de la contamination et des méthodes de dépollution impliquant des oxydants qui pourraient être à l'origine de la formation de produits de dégradation des HAP plus mobiles et potentiellement plus toxiques que les composés parents.

L'étude d'un site contaminé par la méthode employée durant ce travail nécessite trois mois de préparation et d'analyse d'échantillons afin de permettre la confirmation de molécules. Ceci en fait une démarche longue et coûteuse. Cependant l'automatisation de la démarche peut être à l'origine d'une simplification du travail. De plus, si son application est généralisée et normalisée sur les sites industriels, il est possible d'incorporer dans les analyses chimiques les molécules dont la présence et l'activité sont confirmées simplifiant avec le temps, les analyses et les diagnostics des futurs sites étudiés. La création d'une base de données permettrait entre autre de comparer les données d'un site à l'autre afin de faciliter l'étape d'identification. Le coût actuel du diagnostic d'un site contaminé en Europe est en moyenne compris entre 5 000 et 50 000€. La mise en place de cette démarche augmenterait certainement les coûts de diagnostics sur les premiers sites d'études mais permettrait au final une meilleure caractérisation de la contamination. De plus, cette démarche auto-apprenante, s'enrichit au fur et à mesure de son application ce qui entraînerait une diminution progressive des coûts liés aux diagnostics.

Afin de démocratiser la démarche sur les sols et plus particulièrement sur les sites industriels contaminés, il faudrait passer par le développement d'un réseau regroupant les spécialistes de la dépollution des sols et de la bio-analyse. Cependant, les parties prenantes impliquées dans la dépollution des sols font partie d'une communauté dont l'utilisation de la bioanalyse est pour le moment peu connue par rapport à celles qui étudient les milieux aquatiques et atmosphériques. L'application de cette démarche sur les sols pollués et sa généralisation demanderait sa démocratisation auprès de cette communauté.



## **Référence**

## 2. Organismes et sites internet

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (1997) Toxicological profile for benzene, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2000) Toxicological profile for toluene, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2007a) Toxicological profile for ethylbenzene, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2007b) Toxicological profile for xylenes, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA.

Agency for toxic substances and disease registry : U.S. Department of health and human services (2002) Toxicological profile for wood creosote, coal tar creosote, coal tar, coal tar pitch, and coal tar pitch volatiles.

Aït-Aïssa, S. & Creusot, N. (2010). Caractérisation de l'état de contamination de sédiments de rivières par des composés à activité « dioxin-like » : développement et application d'un outil bio-analytique in vitro. INERIS, Rapport d'étude n° DRC-10-102867-04907A

Aït-Aïssa, S. (2009). Outils bio-analytiques in vitro : principe et apports pour la surveillance des contaminants organiques dans le milieu aquatique. INERIS, Rapport d'étude n° -DRC-08-5306-16732A.

AMORCE : association nationale des collectivités, des associations et des entreprises pour la gestion des déchets, de l'énergie et des réseaux de chaleur (2012) Gestion des boues de station d'épuration : Co-traitement avec les déchets ménagers. Série Technique, DT 52. [http://www.amorce.asso.fr/media/filer\\_public/e7/48/e7481c35-99a5-45d6-85d9-a4a2a5e7c409/dt52\\_enque\\_te\\_boues\\_amorce.pdf](http://www.amorce.asso.fr/media/filer_public/e7/48/e7481c35-99a5-45d6-85d9-a4a2a5e7c409/dt52_enque_te_boues_amorce.pdf)

ATSDR. (1994). Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH): update. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta.

ATSDR. (1995) Toxicological profiles for Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA: U.S department of Health and Human Services, Public Health Services.

ATSDR. (1997a) Toxicological Profile for Trichloroethylene. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA.

ATSDR. (1997b) Toxicological Profile for Tetrachloroethylene. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA.

ATSDR. (2000) Toxicological Profile for Methylene Chloride. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA.

Basol (2013) Les sites et sols pollués en France en 2012. [http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/Les\\_sites\\_et\\_sols\\_pollues.pdf](http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/Les_sites_et_sols_pollues.pdf)

Blum, W. E. H. (2008). Characterisation of soil degradation risk: an overview. Threats to Soil Quality in Europe. [http://eusoils.jrc.ec.europa.eu/esdb\\_archive/eusoils\\_docs/other/EUR23438.pdf](http://eusoils.jrc.ec.europa.eu/esdb_archive/eusoils_docs/other/EUR23438.pdf)

Commission of the european communities (2006) Communication from the commission to the council, the european parliament, the european economic and social committee and the committee of the regions. Thematic Strategy for soil protection.

Directive 2001/90/CE de la commission du 26 octobre 2001 portant septième adaptation au progrès technique (créosote) de l'annexe I de la directive 76/769/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres relatives à la limitation de la mise sur le marché et de l'emploi de certaines substances et préparations dangereuses.

Directive 76/769/CEE du 27 juillet 1976 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres relatives à la limitation de la mise sur le marché et de l'emploi de certaines substances et préparations dangereuses.

Dobbie, K.E., Bruneau, P.M.C., Towers, W. (2011) The state of Scotland's soil (March)

Environnement Canada. (2007). Méthode d'essai biologique : Essai d'inhibition de la croissance d'une algue douce. Rapport SPE 1/RM/25. Deuxième édition.

Environnemental code of French republic. <http://www.legifrance.gouv.fr/affichCode.do?cidTexte=LEGITEXT000006074220>

EPA : Liste des 126 polluants prioritaire de l'agence de protection environnementale des Etats-Unis. <http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/pollutants.cfm>

ESBN (European Soil Bureau Network). (2008). Soils Atlas of Europe. [http://eusoils.jrc.ec.europa.eu/projects/soil\\_atlas/download/109.pdf](http://eusoils.jrc.ec.europa.eu/projects/soil_atlas/download/109.pdf)

European commission (2012) Guidelines on best practice to limit, mitigate or compensate soil sealing

European Communities (2009). Sustainable agriculture and soil conservation

Processes of soil degradation. Datasheet n°4 : Salinisation and sodification. <http://agriflife.jrc.ec.europa.eu/documents/FRFactSheet-04.pdf>

Federal Soil Protection Act of 17 March 1998 (BBodSchG). Federal Law Gazette I 1998 p.502

Federal Soil Protection and Contaminated Sites Ordinance (BbodSchV) dated of 12 July 1999. Federal Law Gazette I 1999 p. 1554

Grimm, M., Jones, R., Montanarella, L. (2002) Soil Erosion Risk in Europe. European Soil Bureau Institute for Environment & Sustainability JRC Ispra

<http://assainissement.developpement-durable.gouv.fr>

<http://basias.brgm.fr>

<http://basol.developpement-durable.gouv.fr>

<http://eusoils.jrc.ec.europa.eu/>

IARC. (1973). Certain Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Heterocyclic Compounds. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol. 3, International Agency for Research on Cancer, Lyon.

IARC. (1983). Polynuclear Aromatic Compounds. Part 1, Chemical, Environmental and Experimental Data. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Vol. 32, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon.

IARC. (1984). Polynuclear Aromatic Compounds: Part 3, Industrial Exposures to Aluminum Production, Coal Gasification, Coke Production, and Iron Steel Founding. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Vol. 34, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon.

IARC. (1985). Polynuclear Aromatic Compound: Part 4, Bitumens, Coal tars and Derived products, Shale-oils and Soots. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Vol. 35, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon.

IARC. (1986). Tobacco Smoking. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Vol. 38, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon.

IARC. (1987). Overall evaluation of carcinogenicity: An updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Supplement 7, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon.

IARC. (1989). Diesel and gasoline engine exhausts and some nitroarenes. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human. Vol. 46, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon.

Inchem. (1991) Environmental Health Criteria 122. N-Heaxane.

IPCS. (1998). Selected Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Environmental Health Criteria 202. International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva.

Journal officiel de la république française (2014) Arrêté du 12 décembre 2014 relatif aux conditions d'admission des déchets inertes dans les installations relevant des rubriques 2515, 2516, 2517 et dans les installations de stockage de déchets inertes relevant de la rubrique 2760 de la nomenclature des installations classées <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000029893828&dateTexte=&categorieLien=id>

Millennium Ecosystem Assessment. (2005). Ecosystems and Human Well-being: A Framework for Assessment. Island Press, Washington, DC.

Ministère de l'Écologie, de l'Énergie, du Développement Durable et de l'Aménagement du territoire (2009) Éléments de contexte et réglementation française relatifs à la valorisation des boues issues du traitement des eaux usées. [http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/DGALN\\_-\\_090504\\_lpd\\_i\\_boue\\_synthese\\_internet\\_francais\\_v1.pdf](http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/DGALN_-_090504_lpd_i_boue_synthese_internet_francais_v1.pdf)

Montizaan, G.K., Kramers, P.G.N., Janus, J.A., Posthumus, R. (1989). Integrated Criteria Document Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH): Effects of 10 selected compounds. Appendix to RIVM Report no. 758474007, National Institute of Public Health and Environmental Protection, RIVM, Bilthoven.

Morgan, R.P.C. (1992). Soil Erosion in the Northern Countries of the European Community. EIW Workshop: Elaboration of a Framework of a Code of Good Agricultural Practices, Brussels, 21-22 May 1992.

Observatoire régional de la santé du Rhône-Alpes. (2008). Les PCB (Polychlorobiphényles). Les dossiers de l'environnement de l'ORS. Décembre 2008- n°2. <http://ors-rhone-alpes.org/environnement/pdf/dossier2.pdf>

Ordinance on remediation of polluted sites of Switzerland dated of 26 august 1998

Syndicat Mixte Recyclage Agricole du Haut-Rhin (2001) Tabou(e) Story : ...et nos boues deviennent compost. [http://smra68.net/z\\_pdf/taboue-story/pdf-taboue-support-tous-publics/boues-deviennent-compost.pdf](http://smra68.net/z_pdf/taboue-story/pdf-taboue-support-tous-publics/boues-deviennent-compost.pdf)

US EPA. (1984b). Carcinogen Assessment of Coke Oven Emissions. EPA-600/6-82-003F, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Health and Environmental Assessment, Washington, DC.

Van Liedekerke, M., Prokop, G., Rabl-Berger, S., Kibblewhite, M. & Louwagie, G. (2014), Progress in the management of Contaminated Sites in Europe, JRC Reference Reports, European Commission, Joint Research Centre, Luxembourg, accessed 30 June 2014.

WHO. (2001). Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH). In: WHO Air Quality Guidelines for Europe, 2nd Edition, World Health Organization, Regional Office for Europe, Copenhagen.

Wilbur, S., Bosch, S. (2004) Interaction profile for: benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes (BTEX), Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA.

### 3. Thèses

Bergknut, M. (2006). *Characterization of PAH-contaminated soils focusing on availability, chemical composition and biological effects*. Umeå University.

Creusot, N., Aït-Aïssa, S., Porcher, J-M., Dévier, M-H., & Budzinski, H. (2011) Evaluation of pressurized liquid extraction of mixture of active endocrine disrupting chemicals in sediment using biological and chemical analyses. Thèse : Contribution de l'approche effect directed analysis à l'identification de perturbateurs endocriniens dans les milieux aquatiques.

Gardia-Parege, C. (2015). Développement et applications de l'analyse dirigée par l'effet pour la recherche et l'identification de contaminants à risque pour les écosystèmes aquatiques. Université de bordeaux, école doctorale : spécialité sciences chimiques, spécialité chimie analytique et environnementale.

Piedrafita Carnicer, M-V. (2007). La pollution ponctuelle des sols: Le cas des stations-service dans la Région de Bruxelles-Capitale. PhD thesis

Tarantini, A. (2009). Modulation de la génotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) en mélanges. Life Sciences. Université Joseph-Fourier - Grenoble I. French.

Wessel, N. (2010). Étude des voies de bioactivation du benzo[a]pyrène et du fluoranthène chez la sole commune ( *Solea solea* ) : Profil métabolique et génotoxicité. Ifremer (Thèse). Discipline : physiologie, biologie des organismes, population, interactions. Spécialité :écotoxicologie marine

Wund, P. (2013). Développements d'échantillonneurs passifs pour l'étude de la contamination des eaux par les micropolluants organiques (Obtention du grade de Docteur en Chimie analytique et environnement). Université Bordeaux 1, Talence, n°ordre 4966.

### 4. Livres

Nobre Nunes, A. (2011). Soil Erosion Under Different Land Use and Cover Types in a Marginal Area of Portugal, Soil Erosion Studies, Dr. Danilo Godone (Ed.), ISBN: 978-953-307-710-9, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/soil-erosion-studies/soil-erosion-under-different-land-use-and-cover-typesin-a-marginal-area-of-portugal>

Daily, G.C. (1997). Nature's Services: Societal Dependence on Natural Ecosystems. Island Press, Washington.

DUCHAUFOR (Ph.). (1984). Abrégé de Pédologie. Masson, Paris éd., 220 p.

Sundström, G., Larsson, L., Tarkpea, M., (1986). Creosote. In: Hutzinger, O. (Ed.), Anthropogenic Compounds. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. 159–205.

## 5. Articles scientifiques

Alsberg T, Stenberg U, Westerholm R, Strandell M, Rannug U, Sundvall A, Romert L, Bernson V, Pettersson B, Toftgard R, Franzen B, Jansson M, Gustafsson JA, Egeback KE, Tejle G. (1985). Chemical and biological characterization of organic material from gasoline exhaust particles. *Environ Sci Technol* 19:43–50.

Andersson, J. T., Achten, C. (2015). Time to Say Goodbye to the 16 EPA PAHs? Toward an Up-to-Date Use of PACs for Environmental Purposes. *Polycyclic Aromatic Compounds*, (June 2015), 1–25.

Arey, J., Harger, W. P., Helmig, D., Atkinson, R. (1992). Bioassay-directed fractionation of mutagenic PAH atmospheric photooxidation products and ambient particulate extracts. *Mutation Research - Mutation Research Letters*, 281(1), 67–76.

Armstrong, B.G., Hutchinson, E., Unwin, J., Fletcher, T. (2004) Lung cancer risk after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review and meta-analysis. *Environ Health Perspect*, 112 (9), 970–978

Bach, P.B., Kelley, M.J., Tate, R.C., McCrory, D.C. (2003) Screening for lung cancer: a review of the current literature. *Chest*, 123, 72–82

Bakker, J. F., Belzunce-Segarra, M. J., Castro, R., van de Heuvel-Greve, M., Klamer, H. J. C., Brack, W., Leonards, P. E. G. (2007). Effect Directed Analysis and Toxicity Identification Evaluation. *Sustainable Management of Sediment Resources*, 1(August), 163–214.

Balaguer, P., François, F., Comunale, F., Fenet, H., Boussioux, A.-M., Pons, M., Nicolas, J.-C., Casellas, C. (1999). Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens. *Sci. Total Environ.* 233, 47–56.

Bale, A. S., Barone, S., Scott, C. S., Cooper, G. S. (2011). A review of potential neurotoxic mechanisms among three chlorinated organic solvents. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 255(1), 113–126.

Baran, A., Tarnawski, M. (2013). Ecotoxicology and Environmental Safety Phytotoxkit / Phytotestkit and Microtox s as tools for toxicity assessment of sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98, 19–27.

Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P. (1996). Analytical procedure for the analysis of PAHs in biological tissues: Application to mussels. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 9 (1-4), 241-248.

Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P. (1997). Analytical procedure for the analysis of PAHs in biological tissues by gas chromatography coupled to mass spectrometry: Application to mussels. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 359 (6), 502-509.

Beilen Van, JB., Wubbolts, MG., Witholt, B. (1994) Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. *Biodegradation*. 5(3-4):161-74.

Booth B P. (2009). Welcome to Bioanalysis. *Bioanalysis* 1 (1): 1–2

Boyd, J., Banzhaf, S. (2007). What are ecosystem services? The need for standardized environmental accounting units. *Ecological Economics*, 63(2-3), 616–626.

Brack, W. (2003). Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377(3), 397–407.

Brack, W., Schirmer, K., Erdinger, L., Hollert, H. (2005). Effect-directed analysis of mutagens and ethoxyresorufin-O-deethylase inducers in aquatic sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 2445-2458.

Brack, W., Ulrich, N., Bataineh, M (2011). Separation techniques in effect-directed analysis. *Effect-directed analysis of complex environmental contamination*, *HdB Env Chem*. 15 : 83-118

Cachada, a, Pereira, R., da Silva, E. F., Duarte, a C. (2014). The prediction of PAHs bioavailability in soils using chemical methods: State of the art and future challenges. *The Science of the Total Environment*, 472, 463–80.

Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Le Menach, K., Peluhet, L., Budzinski, H. (2006). Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquatic Toxicology*, 79(3), 257–267.

Campbell, C. G., Borglin, S. E., Green, F. B., Grayson, A., Wozel, E., Stringfellow, W. T. (2006). Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review. *Chemosphere*, 65(8), 1265–1280.

Carmichael, P. L., Ni Shé, M., Hewer, a, Jacob, J., Grimmer, G., Phillips, D. H. (1992). DNA adduct formation in mice following treatment with used engine oil and identification of some of the major adducts by 32P-postlabelling. *Cancer Letters*, 64(2), 137–144.

Casellas, M., Fernandez, P., Bayona, J.M., Solanas, A.M. (1994). Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in urban airborne particulate matter from barcelona (spain). *Chemosphere*, Vol. 30, No. 4, 725-740.

Cassells, N.P., Lane, C.S., Depala, M., Saeed, M. Craston, D.H. (2000) Microtox® testing of pentachlorophenol in soil extracts and quantification by capillary electrochromatography (CEC) – A rapid screening approach for contaminated land. Volume 40, Issue 6, 609–618.

Cébron, A., Faure, P., Lorgeoux, C., Ouvrard, S., Leyval, C. (2013). Experimental increase in availability of a PAH complex organic contamination from an aged contaminated soil: Consequences on biodegradation. *Environmental Pollution*, 177(July), 98–105.

Cerniglia, C.E. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3, 351–368.

Chapman, E V., Helmer, S H., Dave, G., Murimboh, J D. (2012) Utility of bioassays (lettuce, red clover, red fescue, Microtox, MetSTICK, *Hyalella*, bait lamina) in ecological risk screening of acid metal (Zn) contaminated soil. 80, 161–171.



Cheung, Y. L., Gray, T. J. B., Ioannides, C. (1993). Mutagenicity of chrysene, its methyl and benzo derivatives, and their interactions with cytochromes P-450 and the Ah-receptor; relevance to their carcinogenic potency. *Toxicology*, 81(1), 69–86.

Chibwe, L., Geier, M. C., Nakamura, J., Tanguay, R. L., Aitken, M. D., Simonich, S. L. M. (2015). Aerobic Bioremediation of PAH Contaminated Soil Results in Increased Genotoxicity and Developmental Toxicity. *Environmental Science & Technology*, 49(23).

Cornelissen, G., Rigterink, H., ten Hulscher, D.E.M., Vrind, B.A., van Noort, P.C.M., (2001). A simple Tenax extraction method to determine the availability of sediment-sorbed organic compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 706-711.

Cornelissen, G., van Noort, P.C.M., Govers, H.A.J., (1997). Desorption kinetics of chlorobenzenes, polycyclic aromatic hydrocarbons, and polychlorinated biphenyls: sediment extraction with Tenax and effects of contact time and solute hydrophobicity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 1351-1357.

Costanza, R., Arge, R., Groot, R. De, Farberk, S., Grasso, M., Hannon, B., Suttonkk, P. (1997). The value of the world ' s ecosystem services and natural capital. *Nature*, 387(May), 253–260.

Côté, C., Biais, C., Michaud, J. R., Ménard, L., Trottier, S., Gagné, F., Lifshitz, R. (1998). Comparisons between microscale and whole-sediment assays for freshwater sediment toxicity assessment. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 13(1), 93–110.

Creusot, N., Aït-Aïssa, S., Tapie, N., Pardon, P., Brion, F., Sanchez, W., Thybaud, E., Porcher, JM. Budzinski H. (2014) Identification of synthetic steroids in river water downstream from pharmaceutical manufacture discharges based on a bioanalytical approach and passive sampling. *Environ Sci Technol.* 1;48(7):3649-57.

Creusot, N., Budzinski, H., Balaguer, P., Kinani, S., Porcher, J.-M., Aït-Aïssa, S. (2013). Effect-directed analysis of endocrine-disrupting compounds in multi-contaminated sediment: identification of novel ligands of estrogen and pregnane X receptors. *Anal Bioanal Chem.* 405(8):2553-66

Cui, X., Mayer, P., Gan, J. (2013). Methods to assess bioavailability of hydrophobic organic contaminants: Principles, operations, and limitations. *Environmental Pollution*, 172, 223–234.

Cuypers, C., Pancras, T., Grotenhuis, T., Rulkens, W., (2002). The estimation of PAH bioavailability in contaminated sediments using hydroxypropylbeta-cyclodextrin and Triton X-100 extraction techniques. *Chemosphere* 46, 1235-1245.

Delafoulhouze, M., Le Menach, K., Aït-Aïssa, S., Lascourreges, J-F., Atteia, O., Budzinski, H. (2015). Application of effect-directed analysis to identify organic pollutants in industrial soil polluted by creosote. **Article to submit**

Della Torre, C., Mariottini, M., Malysheva, A., Focardi, S. E., Corsi, I. (2013). Occurrence of PCDD/PCDFs and PCBs in soil and comparison with CYP1A response in PLHC-1 cell line. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 94, 104–11.

Denison, M. S., Zhao, B., Baston, D. S., Clark, G. C., Murata, H., Han, D. (2004). Recombinant cell bioassay systems for the detection and relative quantitation of halogenated dioxins and related chemicals. *Talanta*, 63(5), 1123–33.

Desbrow, C., Routledge, E. J., Brighty, G. C., Sumpter, J. P., Waldock, M. (1998). Identification of estrogenic chemical in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1549–1558, (97), 1549–1558.

Díaz-Cruz, M. S., García-Galán, M. J., Guerra, P., Jelic, a., Postigo, C., Eljarrat, E., Barceló, D. (2009). Analysis of selected emerging contaminants in sewage sludge. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 28(11), 1263–1275.

Duffus, J. H. (2002). “Heavy metals” a meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 74(5), 793–807.

Dutka, B.J., Teichgräber, K., Lifshitz, R. (1995). A modified SOS-Chromotest procedure to test for genotoxicity and cytotoxicity in sediments directly without extraction. *Chemosphere*, Volume 31, Issue 5, 3273-3289.

Dyreborg, S., Arvin, E., Broholm, K., (1997). Biodegradation of NSO compounds under different redox-conditions. *J. Contam. Hydrol.* 25 (3–4), 177–197.

Eggen, R. I. L., Segner, H. (2003). The potential of mechanism-based bioanalytical tools in ecotoxicological exposure and effect assessment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377(3), 386–396.

El-Deiry, W.S., Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Kinzler, K.W. Vogelstein, B. (1992). Human genomic DNA sequences define a consensus DNA binding site for p53, *Nat. Genet.* 1 45–49.

Eric Thybaud. (1998) Les tests d'ecotoxicite terrestre. *Seminaire National sur l'Ecotoxicologie des sols et des dechets*, Paris, France. pp.46-56.

Eriksson, M., Dalhammar, G., Borg-Karlson, a K. (2000). Biological degradation of selected hydrocarbons in an old PAH/creosote contaminated soil from a gas work site. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(5), 619–626.

Escher, B. I., Bramaz, N., Mueller, J. F., Quayle, P., Rutishauser, S., Vermeirssen, E. L. M. (2008). Toxic equivalent concentrations (TEQs) for baseline toxicity and specific modes of action as a tool to improve interpretation of ecotoxicity testing of environmental samples. *Journal of Environmental Monitoring : JEM*, 10(5), 612–621.

Fent, K. (2001). Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicology in Vitro : An International Journal Published in Association with BIBRA*, 15(4-5), 477–88.

Fernandez P, Grifoll M, Solanas AM, Bayona JM, Albaiges J. (1992). Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in coastal sediments. *Environ Sci Technol* 26:817–829.

- Fetter, E., Krauss, M., Brion, F., Kah, O., Scholz, S., Brack, W. (2014). Effect-directed analysis for estrogenic compounds in a fluvial sediment sample using transgenic cyp19a1b-GFP zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology*, 154, 221–229.
- Fiehn, O., Vigelahn, L., Kalnowski, G., Reemtsma, T., Jekel, M. (1997). Toxicity-directed fractionation of tannery wastewater using solid-phase extraction and luminescence inhibition in microtiter plates. *Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica*, 25(1), 11–16.
- Foley, J.A., DeFries, R., Asner, G.P., Barford, C., Bonan, G., Carpenter, S.R. et al. (2005). Global consequences of land use. *Science*, 309, 570–574.
- Fujii, S., Miyajima, Y., Masuno, H., Kagechika, H. (2013). Increased hydrophobicity and estrogenic activity of simple phenols with silicon and germanium-containing substituents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(1), 160–6.
- Garon, D., Krivobok, S., Seigle-Murandi, F. (2000). Fungal degradation of fluorene. *Chemosphere*, 40(1), 91–7.
- Grung, M., Lichtenthaler, R., Ahel, M., Tollefsen, K. E., Langford, K., Thomas, K. V. (2007). Effects-directed analysis of organic toxicants in wastewater effluent from Zagreb, Croatia. *Chemosphere*, 67(1), 108–120.
- Guillon, a., Le Ménach, K., Flaud, P.-M., Marchand, N., Budzinski, H., Villenave, E. (2013). Chemical characterization and stable carbon isotopic composition of particulate Polycyclic Aromatic Hydrocarbons issued from combustion of 10 Mediterranean woods. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 13(5), 2703–2719.
- Guvenc, N., Alagha, O., & Tuncel, G. (2003) Investigation of soil multi-element composition in Antalya, Turkey. *Environment International*, 29(5), 631–640.
- Hahn, M. E. (2002). Biomarkers and bioassays for detecting dioxin-like compounds in the marine environment. *The Science of the Total Environment*, 289(1-3), 49–69.
- Halm-Lemeille, M. P., Abbaszadeh Fard, E., Latire, T., Ferard, J. F., Costil, K., Lebel, J. M., Serpentine, A. (2014). The effect of different polychlorinated biphenyls on two aquatic models, the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* and the haemocytes from the European abalone *Haliotis tuberculata*. *Chemosphere*, 110, 120–128.
- Hartnik, T., Norli, H. R., Eggen, T., Breedveld, G. D. (2007). Bioassay-directed identification of toxic organic compounds in creosote-contaminated groundwater. *Chemosphere*, 66(3), 435–443.
- Hawliczek, a., Nota, B., Cenijn, P., Kamstra, J., Pieterse, B., Winter, R., Legler, J. (2012). Developmental toxicity and endocrine disrupting potency of 4-azapyrene, benzo[b]fluorene and retene in the zebrafish *Danio rerio*. *Reproductive Toxicology*, 33(2), 213–223.
- Haygarth, P. M., Ritz, K. (2009). The future of soils and land use in the UK: Soil systems for the provision of land-based ecosystem services. *Land Use Policy*, 26(SUPPL. 1), 187–197.
- Hill H. (2009). Development of bioanalysis: a short history. *Bioanalysis* 1 (1): 3–7.

Hirmann, D., Loibner, A. P., Braun, R., Szolar, O. H. J. (2007). Applicability of the bioluminescence inhibition test in the 96-well microplate format for PAH-solutions and elutriates of PAH-contaminated soils. *Chemosphere*, 67(6), 1236–1242.

Hodgson, E. (2001). Factors that affect pesticide metabolism and toxicity. *Handbook of pesticide toxicology*, volume 1, chapter 21, 507-513.

Hofnung, M., quillardet, P., goerlich, O., Touati, E. (1989). SOS Chromotest and the Use of Bacteria for the Detection and Diagnosis of Genotoxic Agents. *New Trends in Genetic Risk Assessment*, Pages 125-136.

Holbrook D, Novak J, Grizzard T, Love N (2002) Estrogen Receptor Agonist Fate during Wastewater and Biosolids Treatment Processes: A Mass Balance Analysis. *Environ. Sci. Technol.* 36, 4533-4539.

Holčapek, M., Jirásko, R., Lída, M. (2012). Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques. *Journal of Chromatography A*, 1259, 3–15.

Horai, H., Arita, M., Kanaya, S., Nihei, Y., Ikeda, T., Suwa, K., Ojima, Y., Tanaka, K., Tanaka, S., Aoshima, K., Oda, Y., Kakazu, Y., Kusano, M., Tohge, T., Matsuda, F., Sawada, Y., Hirai, M.Y., Nakanishi, H., Ikeda, K., Akimoto, N., Maoka, T., Takahashi, H., Ara, T., Sakurai, N., Suzuki, H., Shibata, D., Neumann, S., Iida, T., Tanaka, K., Funatsu, K., Matsuura, F., Soga, T., Taguchi, R., Saito, K. & Nishioka, T. (2010). MassBank: A public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *J. Mass Spectrom.* 45, 703–714.

Houtman, C. J., Booij, P., Jover, E., Pascual del Rio, D., Swart, K., van Velzen, M., Lamoree, M. H. (2006). Estrogenic and dioxin-like compounds in sediment from Zierikzee harbour identified with CALUX assay-directed fractionation combined with one and two dimensional gas chromatography analyses. *Chemosphere*, 65(11), 2244–2252.

Hughes, T.J., Lewtas, J., Claxton, L.D. (1997). Development of a standard reference material for diesel mutagenicity in the Salmonella plate incorporation assay. *Mutat Res.*, 391, 243-258.

Jacobs, M. ., Dickins, M., Lewis, D. F. . (2003). Homology modelling of the nuclear receptors: human oestrogen receptor $\beta$  (hER $\beta$ ), the human pregnane-X-receptor (PXR), the Ah receptor (AhR) and the constitutive androstane receptor (CAR) ligand binding domains from the human oestrogen receptor  $\alpha$  (hER $\alpha$ ) crystal structure, and the human peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) ligand binding domain from the human PPAR $\gamma$  crystal structure. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 84(2-3), 117–132.

Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. B., Beeregowda, K. N. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology*, 7(2).

Janosek, J., Hilscherová, K., Bláha, L., Holoubek, I. (2006). Environmental xenobiotics and nuclear receptors--interactions, effects and in vitro assessment. *Toxicology in Vitro : An International Journal Published in Association with BIBRA*, 20(1), 18–37.

- Janz, S., Raabe, F., Wolff, G. (1990). Application of an alternative approach for using the SOS chromotest to screen complex indeterminate mixtures. *Zentralblatt für Mikrobiologie*, 145(3), 177-182.
- Jop, K.M., Kendall, T.Z., Askew, A.M., Foster, R.B. (1991) Use of fractionation procedures and extensive chemical analysis for toxicity identification of a chemical plant effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 10(8), 981-990.
- Jung, D. K. J., Klaus, T., Fent, K. (2001). Cytochrome P450 induction by nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons, azaarenes, and binary mixtures in fish hepatoma cell line PLHC-1. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(1), 149–159.
- Kaisarevic, S., Varel, U. L. V, Orcic, D., Streck, G., Schulze, T., Pogrmic, K., Kovacevic, R. (2009). Effect-directed analysis of contaminated sediment from the wastewater canal in Pancevo industrial area, Serbia. *Chemosphere*, 77(7), 907–913.
- Kelsey, J.W., Kottler, B.D., Alexander, M., (1997). Selective chemical extract to predict bioavailability of soil-aged organic chemicals. *Environmental Science & Technology* 31, 214-217.
- Khim JS, Lee KT, Villeneuve DL, Kannan K, Giesy JP, Koh CH (2001) In Vitro Bioassay Determination of Dioxin-Like and Estrogenic Activity in Sediment and Water from Ulsan Bay and Its Vicinity, Korea. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 151–160.
- Kim, K.-H., Jahan, S. A., Kabir, E., Brown, R. J. C. (2013). A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environment International*, 60, 71–80.
- Kinani, S., Bouchonnet, S., Creusot, N., Bourcier, S., Balaguer, P., Porcher, J.-M., Aït-Aïssa, S. (2010). Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers. *Environ. Pollut.* 158, 74–83.
- Kochany, J. and Maguire, R.J. (1994). Abiotic transformations of polynuclear aromatic hydrocarbons and polynuclear aromatic nitrogen heterocycles in aquatic environments. *Sci. Total Environ.* 144, 17–31.
- Koganti, a, Singh, R., Rozett, K., Modi, N., Goldstein, L. S., Roy, T. a, Weyand, E. H. (2000). 7H-benzo[c]fluorene: a major DNA adduct-forming component of coal tar. *Carcinogenesis*, 21(8), 1601–1609.
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, JC., et al. (1997) *Biomarqueurs en écotoxicologie*. Masson, Paris
- Langevin, R., Rasmussen, J.B., Slotterduk, H. & Blaise, C. (1992). Genotoxicity in water and sediment extracts from the St Lawrence river system, using the SOS chromotest. *Water Research*. 26(4), 419-429.
- Larsson, M., Giesy, J. P., Engwall, M. (2014). AhR-mediated activities of polycyclic aromatic compound (PAC) mixtures are predictable by the concept of concentration addition. *Environment International*, 73, 94–103.

- Lau, E. V., Gan, S., Ng, H. K. (2010). Extraction techniques for polycyclic aromatic hydrocarbons in soils. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2010.
- Laville, N., Aït-Aïssa, S., Gomez, E., Casellas, C., Porcher, J.M. (2004). Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. *Toxicology*. 196(1–2), 41–55.
- LaVoie, E. J., Briggs, G., Bedenko, V., Hoffmann, D. (1982). Mutagenicity of substituted carbazoles in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 101(2), 141–150.
- Le Curieux, F., Giller, S., Gauthier, L., Erb, F., Marzin, D., (1995). Study of the genotoxic activity of six halogenated acetonitriles, using the SOS chromotest, the Ames-fluctuation test and the newt micronucleus test. *Mutation Research - Genetic Toxicology* 341, 289–302.
- Legler, J., van Velzen, M., Ceniijn, P. H., Houtman, C. J., Lamoree, M. H., Wegener, J. W. (2011). Effect-directed analysis of municipal landfill soil reveals novel developmental toxicants in the zebrafish *Danio rerio*. *Environmental Science & Technology*, 45(19), 8552–8.
- Leonards, P., Brix, R., Barcelo, D. Lamoree, M. (2011) Advanced GC-MS and LC-MS tools for structure elucidation in effect-directed analysis. W. Brack (ed.), *Effect-Directed Analysis of Complex Environmental Contamination*, HdB Env Chem, 15: 143–166.
- Levine, A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division, *Cell* 88 323–331.
- Lewis, D. F. V, Ioannides, C., Parke, D. V. (1998). Cytochromes P450 and species differences in xenobiotic metabolism and activation of carcinogen. *Environmental Health Perspectives*, 106(10), 633–641.
- Liscio, C., Abdul-Sada, A., Al-Salhi, R., Ramsey, M. H., Hill, E. M. (2014). Methodology for profiling anti-androgen mixtures in river water using multiple passive samplers and bioassay-directed analyses. *Water Research*, 57, 258–269.
- Liste, H., & Alexander, M., (2002). Butanol extraction to predict bioavailability of PAHs in soil. *Chemosphere* 46, 1011–1017.
- Louiz, I., Kinani, S., Gouze, M.-E., Ben-Attia, M., Menif, D., Bouchonnet, S., Porcher, J.M., Ben-Hassine, O.K., Aït-Aïssa, S. (2008). 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). *Sci. Total Environ.* 402, 318–329.
- Lübcke-von Varel, U., Bataineh, M., Lohrmann, S., Löffler, I., Schulze, T., Flückiger-Isler, S., Brack, W. (2012). Identification and quantitative confirmation of dinitropyrenes and 3-nitrobenzanthrone as major mutagens in contaminated sediments. *Environment International*, 44, 31–9.
- Lundstedt, S., Persson, Y., Öberg, L. (2006). Transformation of PAHs during ethanol-Fenton treatment of an aged gasworks' soil. *Chemosphere*, 65(8), 1288–1294.

Lundstedt, S., White, P A., Lemieux, C L., Lynes, K D., Lambert, I B., berg, L O., Haglund P., Tysklind, M. (2007). Sources, fate, and toxic hazards of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) at PAH contaminated sites. *Ambio a journal of the human environment*. 36(6), 475-485.

Machala, M., Vondracek, J., Blaha, L., Ciganek, M., Neca, J.V. (2001). Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using in vitro reporter gene assay. *Mutat Res* 497, 49-62.

Mamber, S.W., Okasinski, W.G., Pinter, C.D., Tunac, J.B. (1986). The Escherichia coli K-12 SOS chromotest agar spot test for simple, rapid detection of genotoxic agents. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 171(2-3), 83-90.

Mamindy-pajany, Y., Geret, F., Roméo, M., Hurel, C., Marmier, N. (2012). Chemosphere Ex situ remediation of contaminated sediments using mineral additives : Assessment of pollutant bioavailability with the Microtox solid phase test. *Chemosphere*, 86(11), 1112-1116.

Marvin, C H., McCarry, B E., Villella, J., Allan, L M., Bryant D W. (2000) Chemical and biological profiles of sediments as indicators of sources of contamination in Hamilton Harbour. Part II: Bioassay-directed fractionation using the Ames Salmonella/microsome assay. 41(7), 989-999.

Marvin, C. H., McCarry, B. E., Lundrigan, J. a., Roberts, K., Bryant, D. W. (1999). Bioassay-directed fractionation of PAH of molecular mass 302 in coal tar-contaminated sediment. *Science of the Total Environment*, 231(2-3), 135-144.

Reemtsma, T., Putschew, A., Jekel, M. (1999). Industrial wastewater analysis: A toxicity-directed approach. *Waste Management*, 19(2), 181-188.

Marvin, C. H., Tessaro, M., McCarry, B. E., Bryant, D. W. (1994). A bioassay-directed investigation of Sydney Harbour sediment. *Science of the Total Environment*, 156(2), 119-131.

Mcfall, T., Booth, G. M., Lee, M. L., Tominaga, Y., Pratap, R., Tedjamulia, M., Castle, R. N. (1984). Mutagenic activity of methyl-substituted tri- and tetracyclic aromatic sulfur heterocycles. *Mutation Research*. 135, 97-103.

Melnyk, a., Dettlaff, a., Kuklińska, K., Namieśnik, J., Wolska, L. (2015). Concentration and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in surface soil near a municipal solid waste (MSW) landfill. *Science of The Total Environment*, 530-531, 18-27.

Meyer, S., Cartellieri, S., Steinhart, H. (1999). Simultaneous determination of PAHs, hetero-PAHs (N, S, O), and their degradation products in creosote-contaminated soils: method development, validation, and application to hazardous waste sites. *Anal. Chem.* 71, 4023-4029.

Michel, X.R., Cassand, P.M., Narbonne, J.F. (1993). Activation of benzo[a]pyrene and 2-aminoanthracene to bacteria mutagens by mussel digestive gland postmitochondrial fraction. *Mutation Research Letters* 301 (2):113-119.

- Moggs, J.G., Orphanides, G. (2001). Estrogen receptors: orchestrators of pleiotropic cellular responses. *EMBO Rep.* 2 (9), 775–781.
- Moller M, Hagen I, Ramdahl T. (1985). Mutagenicity of polycyclic aromatic compounds (PAC) identified in source emissions and ambient air. *Mutat Res* 157:149–156.
- Moret, S., Purcaro, G., Conte, L. S. (2007). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) content of soil and olives collected in areas contaminated with creosote released from old railway ties. *The Science of the Total Environment*, 386(1-3), 1–8.
- Motto, I., Bordogna, A., Soshilov, A. a., Denison, M. S., & Bonati, L. (2011). New aryl hydrocarbon receptor homology model targeted to improve docking reliability. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51, 2868–2881.
- Mueller, S.O. (2002). Overview of in vitro tools to assess the estrogenic and antiestrogenic activity of phytoestrogens. *Journal of chromatography B-analytical technologies in the biomedical and life science* 777(1-2): 155-165.
- Müller, A., Björklund, E., von Holst, C., (2001). On-line clean-up of pressurized liquid extracts for the determination of polychlorinated biphenyls in feedingstuffs and food matrices using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 925, 197-205.
- Murk, A. J., Legler, J., van Lipzig, M. M. H., Meerman, J. H. N., Belfroid, A. C., Spenkelink, A. Vethaak, D. (2002). Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three in vitro bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 21(1), 16–23.
- Nakayama, Y. (2004). Isolation of p53-target genes and their functional analysis, *Cancer Sci.* 95 7–11.
- Newman, M. (2009) *Fundamental of ecotoxicology*. CRC Press.
- Nie, X., Fan, C., Wang, Z., Su, T., Liu, X., An T. (2015) Toxic assessment of the leachates of paddy soils and river sediments from e-waste dismantling sites to microalga, *Pseudokirchneriella subcapitata*. 111, 168–176.
- Nieto, A., Borrull, F., Pocurull, E., Marcé, R. M. (2010). Pressurized liquid extraction: A useful technique to extract pharmaceuticals and personal-care products from sewage sludge. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 29(7), 752–764.
- Nishioka, M. G., Chuang, C. C., Petersen, B. a., Austin, A., Lewtas, J. (1985). Development and quantitative evaluation of a compound class fractionation scheme for bioassay-directed characterization of ambient air particulate matter. *Environment International*, 11(2-4), 137–146.
- Nylund, L., Hakala, E., Sorsa, M. (1992). Application of a semi-automated SOS chromotest for measuring genotoxicities of complex environmental mixtures containing polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*. 276(1–2), 125–13.



- Oberemm, A., Onyon, L., Gundert-Remy, U. (2005). How can toxicogenomics inform risk assessment? *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207(2 SUPPL.), 592–598.
- Oh, S. M., Chung, K. H. (2006). Identification of mammalian cell genotoxins in respirable diesel exhaust particles by bioassay-directed chemical analysis. *Toxicology Letters*, 161(3), 226–235.
- Oh, S. M., Kim, H. R., Park, H. K., Choi, K., Ryu, J., Shin, H. S., Chung, K. H. (2009). Identification of estrogen-like effects and biologically active compounds in river water using bioassays and chemical analysis. *Science of the Total Environment*, 407(21), 5787–5794.
- Ohno, K., Ishihata, K., Tanaka-Azuma, Y., Yamada, T. (2008). A genotoxicity test system based on p53R2 gene expression in human cells: assessment of its reactivity to various classes of genotoxic chemicals. *Mutation Research*, 656(1-2), 27–35.
- Ohno, K., Tanaka-Azuma, Y., Yoneda, Y., Yamada, T. (2005). Genotoxicity test system based on p53R2 gene expression in human cells: examination with 80 chemicals. *Mutation Research*, 588(1), 47–57.
- Panagos, P., Hiederer, R., Van Liedekerke, M., Bampa, F. (2013). Estimating soil organic carbon in Europe based on data collected through an European network. *Ecological Indicators*, 24, 439–450.
- Phillips, D. H. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutation Research*, 443(1-2), 139–147.
- Piskorska-Pliszczynska, J., Keys, B., Safe S., Newman, M.S. (1986). The cytosolic receptor binding affinities and AHH induction potencies of 29 polynuclear aromatic hydrocarbons. *Toxicol Lett* 34,67-74.
- Pitts JN, Lokensgard DM, Harger W, Fisher TS, Mejia V, Schuler JJ, Scorziell GM, Katzenstein YA. (1982). Mutagens in diesel exhaust particulate. Identification and direct activities of 6-nitrobenzo[a]pyrene, 9-nitroanthracene, 1-nitropyrene and 5H-phenanthro[4,5-bcd]pyran-5-one. *Mutat Res* 103:241–249.
- Poole, LB. (1996) Flavin-dependent alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. 2. Cystine disulfides involved in catalysis of peroxide reduction. *Biochemistry*, 9;35(1):65-75.
- Quillardet, P., Hofnung, M. (1993) The SOS chromotest : a review. *Mutation Research*, 297 ; 235-279.
- Quillardet, P., Bellecombe, C., Hofnung, M. (1985). The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: validation study with 83 compounds. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*. 147(3), 79-95.
- Quillardet, P., Huisman, O., D'Ari, R., Hofnung, M. (1982). The SOS chromotest: Direct assay of the expression of gene *sfiA* as a measure of genotoxicity of chemicals. *Biochimie*. 64(8–9), 797-801.

- Reemtsma, T., Putschew, A., Jekel, M. (1999). Industrial wastewater analysis: A toxicity-directed approach. *Waste Management*, 19(2), 181–188.
- Regueiro, J., Matamoros, V., Thibaut, R., Porte, C., Bayona, J. M. (2013). Use of effect-directed analysis for the identification of organic toxicants in surface flow constructed wetland sediments. *Chemosphere*, 91(8), 1165–1175.
- Reid, B.J., Stokes, J.D., Jones, K.C., Semple, K.T., (2000). Non-exhaustive cyclodextrin-based extraction technique for the evaluation of PAH bioavailability. *Environmental Science & Technology* 34, 3174-3179.
- Reineke, N., Bester, K., Hühnerfuss, H., Jastorff, B., Weigel, S. (2002). Bioassay-directed chemical analysis of River Elbe surface water including large volume extractions and high performance fractionation. *Chemosphere*, 47(7), 717–723.
- Riding, M. J., Doick, K. J., Martin, F. L., Jones, K. C., Semple, K. T. (2013). Chemical measures of bioavailability/bioaccessibility of PAHs in soil: Fundamentals to application. *Journal of Hazardous Materials*.
- Rutishauser, B. V, Pesonen, M., Escher, B. I., Ackermann, G. E., Aerni, H.-R., Suter, M. J. F., Eggen, R. I. L. (2004). Comparative analysis of estrogenic activity in sewage treatment plant effluents involving three in vitro assays and chemical analysis of steroids. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 23(4), 857–864.
- Safe, S. H. (2016). Hazard and Risk Assessment of Chemical Mixtures Using the Toxic Equivalency Factor Approach Hazard and Risk Assessment of Chemical Mixtures Using the Toxic Equivalency Factor Approach, (SEPTEMBER 1998).
- Schaeffer, TL., Cantwell, SG., Brown, JL., Watt, DS., Fall, RR. (1979) Microbial growth on hydrocarbons: terminal branching inhibits biodegradation. *Applied and environmental microbiology*, 38(4) :742-6
- Schirmer, K., Fischer, B. B., Madureira, D. J., Pillai, S. (2010). Transcriptomics in ecotoxicology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(3), 917–923.
- Schmitt, C., Streck, G., Lamoree, M., Leonards, P., Brack, W., De Deckere, E. (2011). Effect directed analysis of riverine sediments--the usefulness of *Potamopyrgus antipodarum* for in vivo effect confirmation of endocrine disruption. *Aquatic Toxicology Amsterdam Netherlands*, 101(1), 237–243.
- Schulze, T., Weiss, S., Schymanski, E., von der Ohe, P. C., Schmitt-Jansen, M., Altenburger, R., Brack, W. (2010). Identification of a phytotoxic photo-transformation product of diclofenac using effect-directed analysis. *Environmental Pollution*, 158(5), 1461–1466.
- Segner, H., Behrens, A., Joyce, E. M., Schirmer, K. (2000). Transient induction of 7-ethoxyresoru ® n-O- deethylase ( EROD ) activity by medium change in the rainbow trout liver cell line , RTL-W1, 50, 489–493.

Semple, K. T., Doick, K. J., Wick, L. Y., Harms, H. (2007). Microbial interactions with organic contaminants in soil: definitions, processes and measurement. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*, 150(1), 166–76.

Simon, E., Lamoree, M. H., Hamers, T., & de Boer, J. (2015). Challenges in effect-directed analysis with a focus on biological samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 67, 179–191.

Smith, C.A., Maille, G.O., Want, E.J., Qin, C., Trauger, S.A., Brandon, T.R., Custodio, D.E., Abagyan, R., Siuzdak, G. (2005). METLIN: A Metabolite Mass Spectral Database. *Proc. 9th Int. Congr. Ther. Drug Monit. Clin. Toxicol.* 27, 747 – 751.

Snape, J. R., Maund, S. J., Pickford, D. B., Hutchinson, T. H. (2004). Ecotoxicogenomics: The challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquatic Toxicology*, 67(2), 143–154.

Sundberg, H., Ishaq, R., Tjärnlund, U., Åkerman, G., Grunder, K., Bandh, C., Balk, L. (2006). Contribution of commonly analyzed polycyclic aromatic hydrocarbons ( PAHs ) to potential toxicity in early life stages of rainbow trout ( *Oncorhynchus mykiss* ). *Water*, 1333, 1320–1333.

Szyczewski, P., Siepak, J., Niedzielski, P., Sobczynski, T. (2009). Research on heavy metals in Poland. *Polish Journal of Environmental Studies*, 18(5), 755–768.

Tadeo, J L., Sacher-Brunete, C., Alberto, B., Garcia-Valcarcel, A I., Pérez R A. (2012) Analysis of emerging organic contaminants in environmental solid samples. *Central European Journal of Chemistry*. 10(3), 480-520.

Tapie, N., Budzinski, H., Le Ménach, K., (2008). Fast and efficient extraction methods for the analysis of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in biological matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391, 2169-2177.

Tapie, N., Menach, K. Le, Pasquaud, S., Elie, P., Devier, M. H., Budzinski, H. (2011). PBDE and PCB contamination of eels from the Gironde estuary: From glass eels to silver eels. *Chemosphere*, 83(2), 175–185.

Thomas Jonhson (2005) *Microtox® Acute Toxicity Test. Small-scale Freshwater Toxicity Investigations*, Vol. 1, 69-105.

Till, M., Riebniger, D., Schmitz, H.-J., Schrenk, D. (1999). Potency of various polycyclic aromatic hydrocarbons as inducers of CYP1A1 in rat hepatocyte cultures. *Chemico-Biological Interactions* 117 (2):135-150.

Unwin, J., Cocker, J., Scobbie, E., Chambers, H. (2006) An assessment of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in the UK. *Ann Occup Hyg*, 50 (4), 395–403

Van den Berg, M., Peterson, R E. (2006). The 2005 World Health Organization Reevaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-Like Compounds. *Toxicological Sciences*, 93(2), 223–241.

Vane, C. H., Kim, A. W., Beriro, D. J., Cave, M. R., Knights, K., Moss-Hayes, V., Nathanail, P. C. (2014). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and polychlorinated biphenyls (PCB) in urban soils of Greater London, UK. *Applied Geochemistry*, 51, 303–314.

Vega-Morales, T., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J. J. (2013). Evaluation of the presence of endocrine-disrupting compounds in dissolved and solid wastewater treatment plant samples of Gran Canaria Island (Spain). *BioMed Research International*. 2013, 15.

Villeneuve, D. L., Khim, J. S., Kannan, K., Giesy, J. P. (2001). In vitro response of fish and mammalian cells to complex mixtures of polychlorinated naphthalenes, polychlorinated biphenyls, and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 54(1-2), 125–41.

Vindimian, E., Robaut, C., Fillion, G., (1983). A method for cooperative and non cooperative binding studies using non linear regression analysis on a microcomputer. *J. Appl. Biochem.* 5, 261–268.

Wang, JD., Chang, YC., Kao, KP., Huang, CC., Lin, CC., Yeh, WY. (1986) An outbreak of N-hexane induced polyneuropathy among press proofing workers in Taipei. *American journal of industrial medicine*, 10(2):111-8.

White, J. J., Schmitt, C. J., & Tillitt, D. E. (2004). The H4IIE Cell Bioassay as an Indicator of Dioxin-like Chemicals in Wildlife and the Environment. *Critical Reviews in Toxicology*. 34, 1–83.

Whyte, J. J. & Tillitt, D. E. (2001). Erod activity. <http://www.cerc.usgs.gov/pubs/BEST/EROD.pdf>

Wincent, E., Jönsson, M. E., Bottai, M., Lundstedt, S., Dreij, K. (2015). Aryl Hydrocarbon Receptor Activation and Developmental Toxicity in Zebrafish in Response to Soil Extracts Containing Unsubstituted and Oxygenated PAHs. *Environmental Science & Technology*, 49(6), 3869–3877.

Wischmann, H. and Steinhart, H. (1997). The formation of PAH oxidation products in soils and soil/compost mixtures. *Chemosphere* 35, 1681–1698.

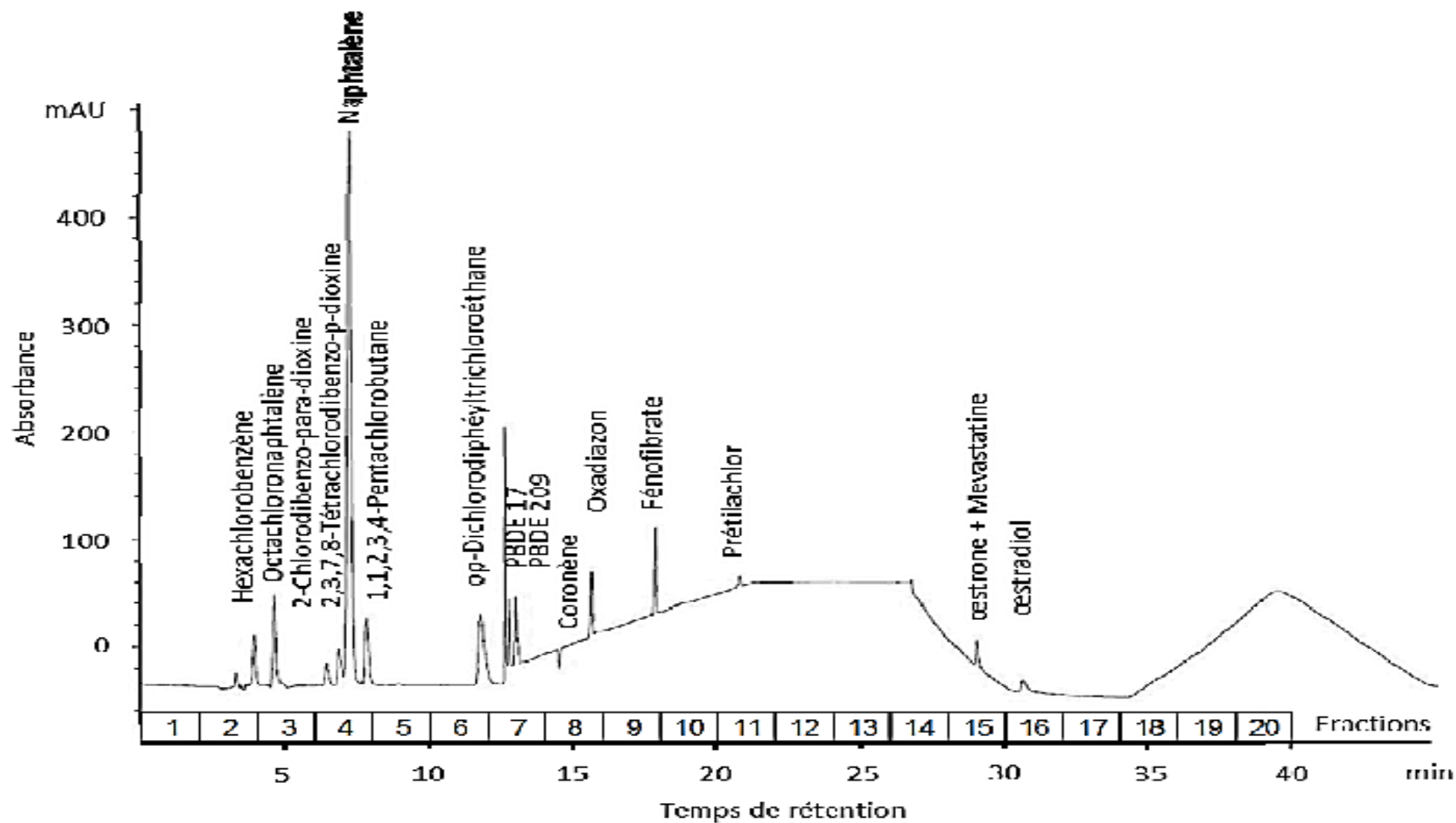
Wölz, J., Brack, W., Moehlenkamp, C., Claus, E., Braunbeck, T., Hollert, H. (2010). Effect-directed analysis of Ah receptor-mediated activities caused by PAHs in suspended particulate matter sampled in flood events. *Science of the Total Environment*, 408(16), 3327–3333.

Yao, Z., Li, J., Xie, H., & Yu, C. (2012). Review on Remediation Technologies of Soil Contaminated by Heavy Metals. *Procedia Environmental Sciences*, 16, 722–729.

Yu, H. (2002). Environmental carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons: photochemistry and phototoxicity. *J. Environ. Sci. Health C20*, 149–183.

## **Annexes**

**Annexe 1** : Profil chromatographique du fractionnement en phase normale par HPLC pour une solution de 16 composés connus.



**Annexe 2** : Activité AhR des différentes molécules trouvées dans les sols. Les concentrations sont exprimées en g de composé par litre. Le pourcentage d'induction maximal correspond à l'activité maximum obtenu pour le composés en se servant de la 2,3,7,8-tétra-chloro-dibenzo-para-dioxine (TCDD). Quand ce pourcentage est précédé du signe >, cela signifie que cette valeur est obtenue pour la concentration maximale testée et qu'il est possible d'obtenir une valeur supérieur d'induction pour ce composés en testant une concentration plus importante. TEF : facteur d'équivalent toxique.

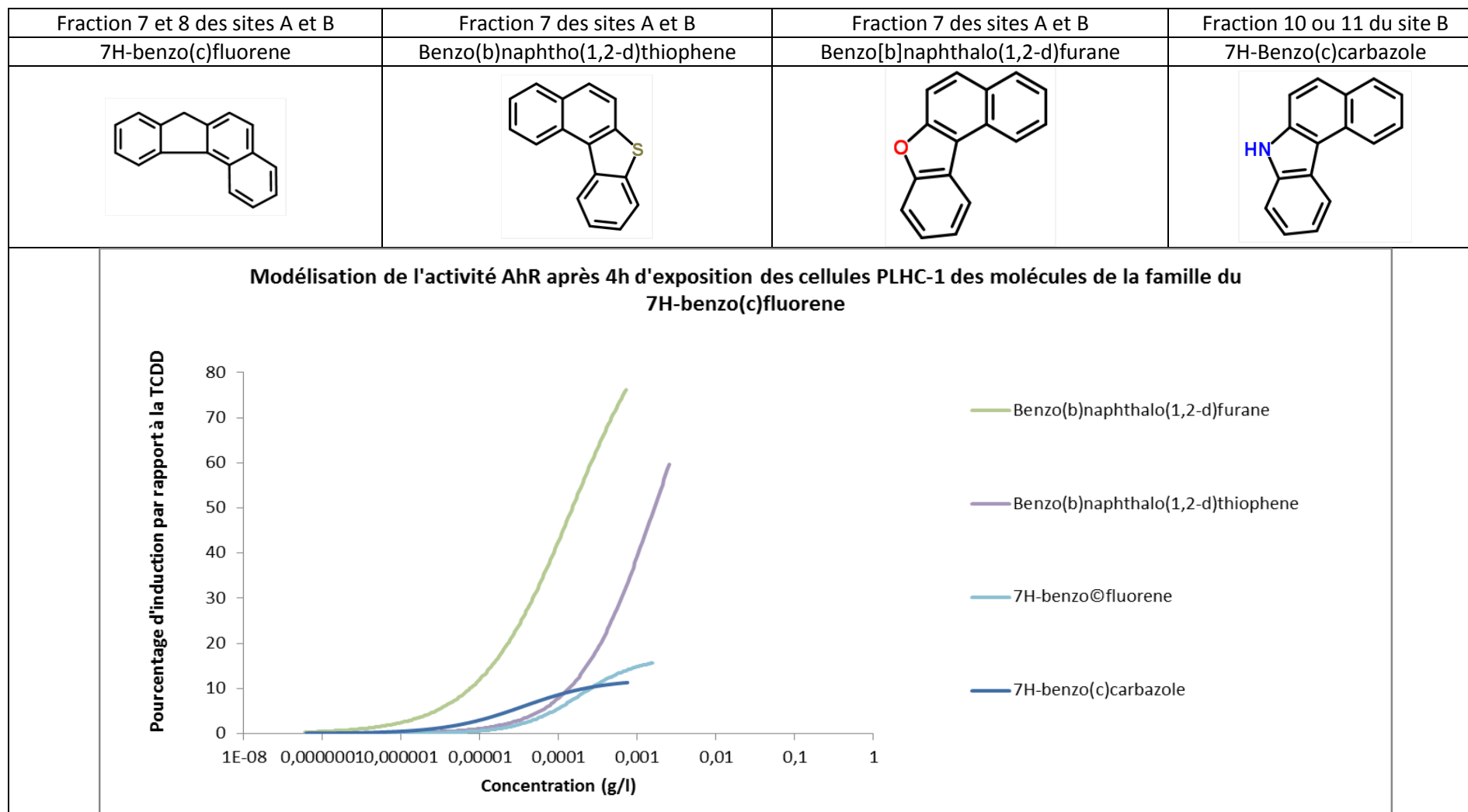
Molécule	Concentration max testée (g/l)	TEF 4h (BaP)				TEF 24h (TCDD)				Fraction
		Max induction (par rapport à la TCDD) %	EC20 (g/l)	EC20 Bap (g/L)	TEF	Max induction (par rapport à la TCDD) %	EC20 (g/l)	EC20 TCDD (g/L)	TEF	
Dibenzo(a,i)pyrene	2,1E-04	116	3,6E-07	5,0E-07	1,36E+00	115	5,24E-06	9,8E-09	1,9E-03	8
Dibenzo(a,h)pyrene	1,1E-03	95	6,0E-07	5,0E-07	8,30E-01	107	1,02E-05	9,8E-09	9,5E-04	8
Dibenzo(a,e)pyrene	1,6E-03	14	ND	5,0E-07	ND	11	ND	9,8E-09	ND	8
Coronene	9,7E-04	0	ND	5,0E-07	ND	0	ND	9,8E-09	ND	8
Benzo(a)fluoranthene	1,8E-03	0	ND	5,0E-07	ND	0	ND	9,8E-09	ND	8
Benzo(a,l)pyrene	1,2E-03	0	ND	5,0E-07	ND	0	ND	9,8E-09	ND	8
Indole	2,3E-03	0	ND	5,5E-07	ND	6	ND	3,8E-08	ND	9 et 10
Galaxolide	4,8E-03	0	ND	5,5E-07	ND	0	ND	3,8E-08	ND	8
Tonalide	7,1E-03	0	ND	5,5E-07	ND	0	ND	3,8E-08	ND	8
2-phenylnaphthalene	4,9E-03	58	5,2E-04	5,5E-07	1,05E-03	>19	5,11E-03	3,8E-08	7,4E-06	7
6-methylindole	5,0E-03	0	ND	6,3E-07	ND	0	ND	3,8E-08	ND	9
Benzo(b)naphtho(1,2-d)thiophene	2,2E-03	55	3,4E-04	6,3E-07	1,84E-03	>21	2,03E-03	6,3E-09	3,1E-06	7
Benzo(b)naphtho(2,3-d)thiophene	1,2E-03	51	1,9E-05	7,1E-07	3,76E-02	42	2,30E-04	3,0E-08	1,3E-04	7
Dibenzothiophene	2,5E-03	0	ND	7,1E-07	ND	0	ND	3,0E-08	ND	7
1-hydroxypyrene	2,2E-03	38	1,4E-04	7,1E-07	5,19E-03	>20	2,18E-03	3,0E-08	1,4E-05	16
Benzo(e)pyrene	4,3E-03	0	ND	7,1E-07	ND	0	ND	3,0E-08	ND	8
Benzo(ghi)fluoranthene	9,7E-05	>5	ND	7,1E-07	ND	0	ND	3,0E-08	ND	7
Benzo(b)naphtho(2,1-d)thiophene	3,3E-03	82	9,4E-06	7,1E-07	7,60E-02	48	2,55E-04	3,0E-08	1,2E-04	7
Cyclopenta(c,d)pyrene	1,0E-04	0	ND	7,1E-07	ND	0	ND	3,0E-08	ND	8
1 methylpyrene	2,6E-03	0	ND	7,1E-07	ND	0	ND	3,0E-08	ND	7

Fluorene	4,9E-03	0	ND	7,1E-07	ND	0	ND	3,0E-08	ND	5 et 6
Triphenylene	2,8E-03	4	ND	7,1E-07	ND	0	ND	3,0E-08	ND	7 et 8
Cyclopenta(def)phenanthrene	1,5E-02	0	ND	9,8E-07	ND	0	ND	1,4E-08	ND	7
Cyclopenta(def)phenanthrene	2,0E-02	33	7,0E-04	9,8E-07	1,40E-03	0	ND	1,4E-08	ND	8 à 13
9,10-Dyhydroanthracene	4,9E-03	0	ND	4,9E-07	ND	0	ND	2,2E-08	ND	7
Benzo[b]naphthalo(2,3-d)furane	2,0E-03	42	1,3E-05	4,9E-07	3,92E-02	30	1,88E-04	2,2E-08	1,2E-04	7
Benzo[b]naphthalo(1,2-d)furane	2,0E-03	73	2,3E-05	6,3E-07	2,74E-02	>6	ND	2,2E-08	ND	7
Benzo(b)naphtho(2,1-d)furane	2,8E-03	61	7,0E-05	5,5E-07	7,84E-03	>47	1,09E-03	3,8E-08	3,4E-05	7
7H-benzo(c)fluorene	1,3E-03	>16	ND	7,1E-07	ND	>11	ND	3,0E-08	ND	7 et 8
11H-benzo(b)fluorene	1,3E-03	69	7,3E-06	7,1E-07	9,74E-02	61	1,32E-04	3,0E-08	2,2E-04	7 et 8
11H-benzo(a)fluorene	4,4E-03	60	2,4E-05	4,9E-07	2,05E-02	16	ND	2,2E-08	ND	7 et 8
7H-Benzo(c)carbazole	2,1E-03	11	ND	5,5E-07	ND	13	ND	3,8E-08	ND	10
11H-Benzo(a)carbazole	2,0E-03	22	1,6E-04	5,5E-07	3,46E-03	7	ND	3,8E-08	ND	10
5H-Benzo(b)carbazole	2,2E-03	90	6,2E-08	6,3E-07	10	89	1,45688E-05	3,8E-08	2,6E-03	10
Benzo(a)fluoren-11-one	4,3E-03	78	2,8E-05	4,9E-07	1,75E-02	44	0,000317801	2,2E-08	7,0E-05	8
Benzo(h)quinoleine	2,0E-03	>44	8,1E-04	4,9E-07	6,05E-04	>3	ND	2,2E-08	ND	10
Benzo(f)quinoleine	4,8E-03	>26	3,0E-03	4,9E-07	1,66E-04	>2	ND	2,2E-08	ND	14
Benzo(c)quinoleine	4,7E-03	28	5,7E-04	4,9E-07	8,68E-04	>1	ND	2,2E-08	ND	13 et 14
2methyl-9,10-anthraquinone	4,8E-03	0	ND	4,9E-07	ND	0	ND	2,2E-08	ND	8 et 9
Benzanthrone	4,8E-03	0	ND	4,9E-07	ND	0	ND	2,2E-08	ND	9 et 10
1,2-benzo(a)anthraquinone	4,7E-03	54	1,6E-05	4,9E-07	3,00E-02	49	6,43E-05	2,2E-08	3,5E-04	8 et 9
9 fluorenone	5,0E-03	30	2,1E-03	4,9E-07	2,40E-04	>7	ND	2,2E-08	ND	8 et 9
Benzo(c)acridine	2,0E-03	23	2,2E-04	4,9E-07	2,20E-03	>10	ND	2,2E-08	ND	8
9,10-anthraquinone	4,8E-03	0	ND	6,3E-07	ND	0	ND	2,2E-08	ND	8 et 9
5,12-naphthacenequinone	2,0E-03	20	5,8E-05	6,1E-07	1,05E-02	>31	8,87E-04	6,8E-09	7,7E-06	9
2,4bis(dimethylbenzyl)phenol	2,1E-03	0	ND	6,3E-07	ND	0	ND	6,8E-09	ND	10

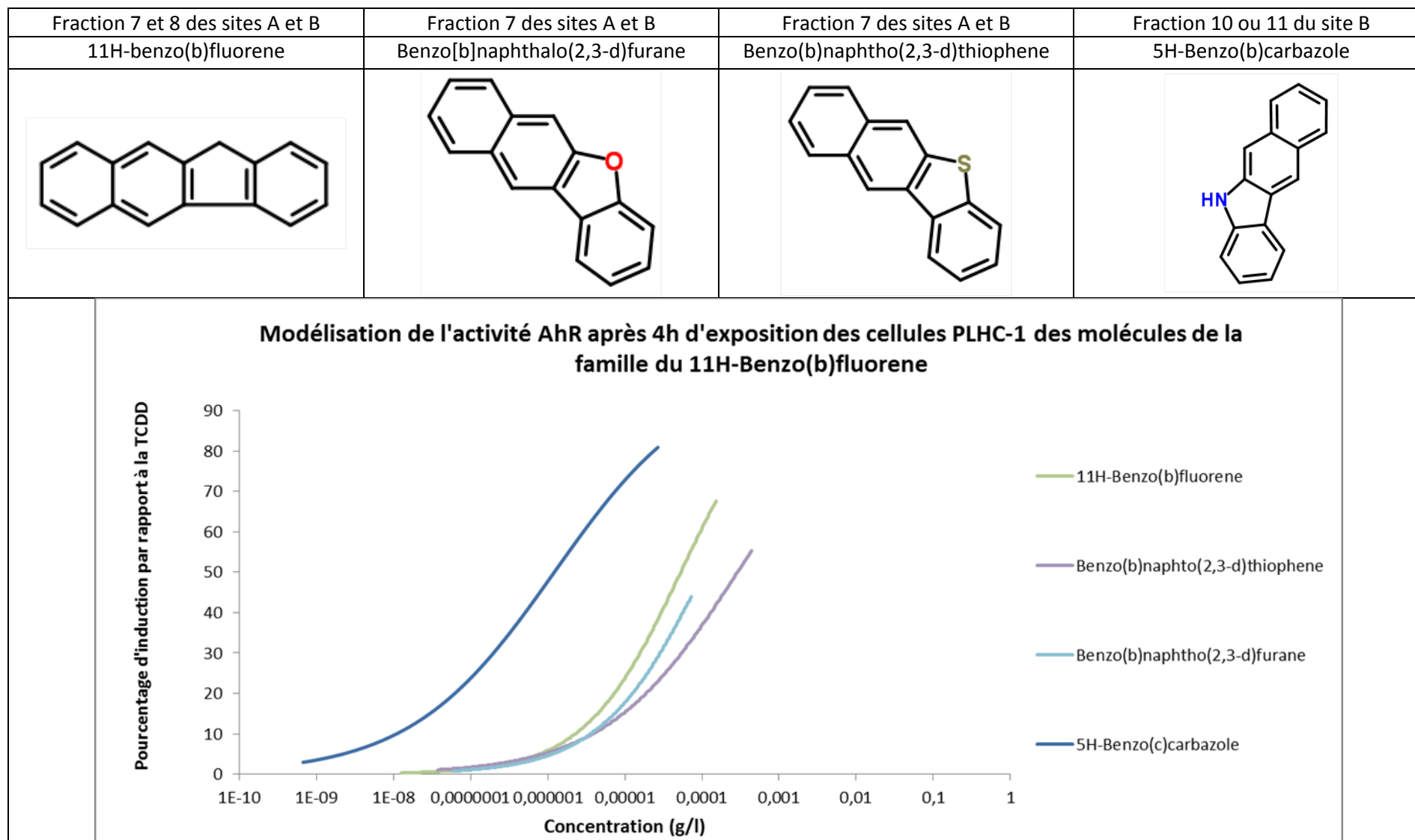


### Annexe 3 : Résultats des modélisations pour les molécules aux structures similaires

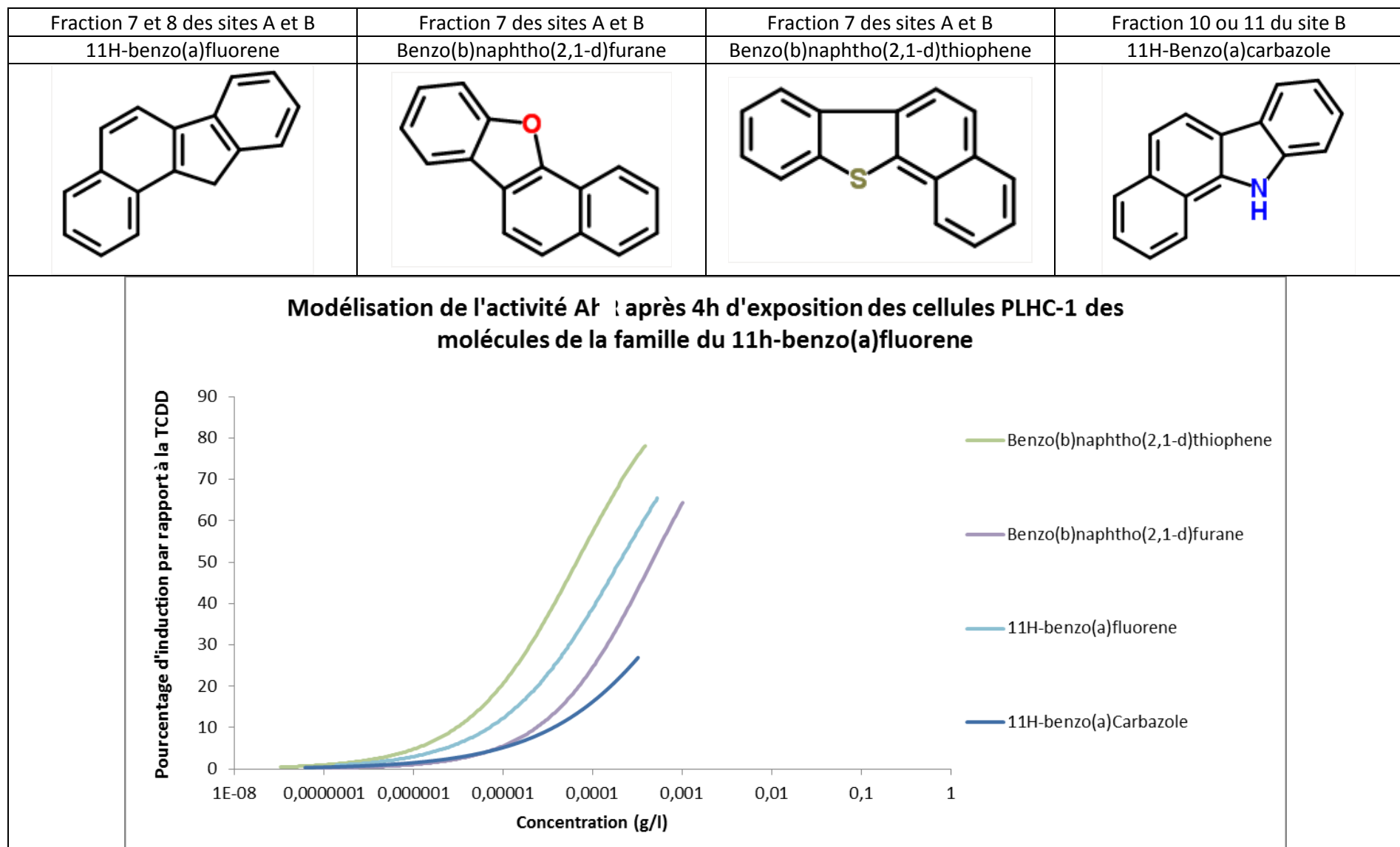
- 7H-benzo(c)fluorene, Benzo(b)naphtho(1,2-d)thiophene, Benzo[b]naphthalo(1,2-d)furane et 7H-Benzo(c)carbazole



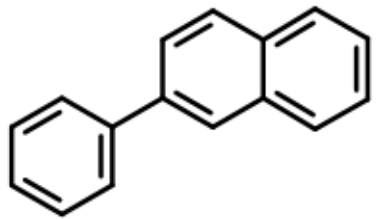
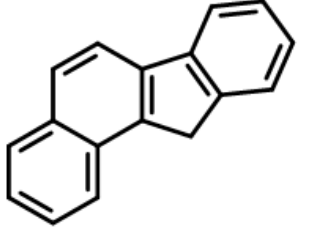
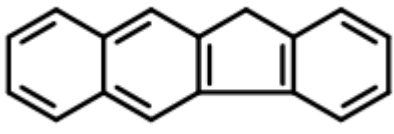
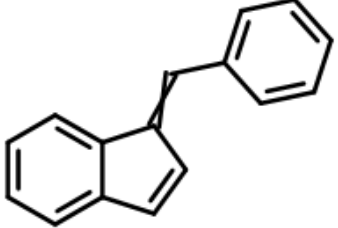
- 11H-benzo(b)fluorene, Benzo[b]naphthalo(2,3-d)furane, Benzo(b)naphtho(2,3-d)thiophene et 5H-Benzo(b)carbazole



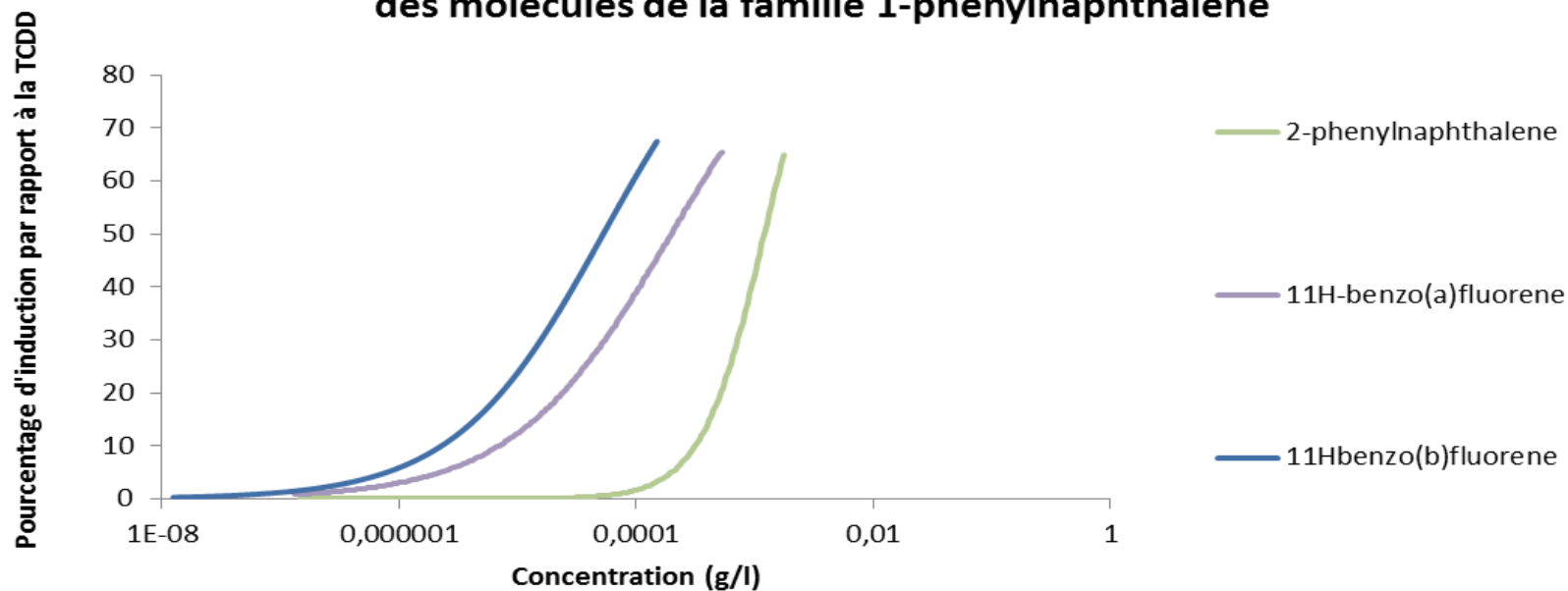
- 11H-benzo(a)fluorene, Benzo(b)naphtho(2,1-d)furane, Benzo(b)naphtho(2,1-d)thiophene et 11H-Benzo(a)carbazole



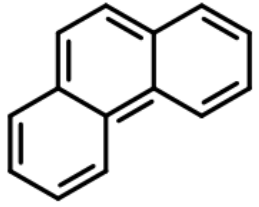
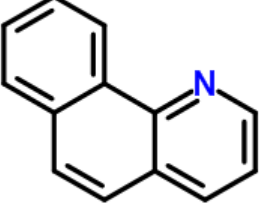
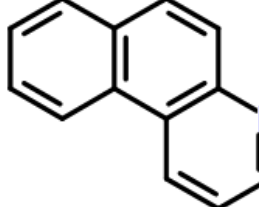
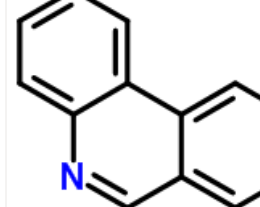
- 2-Phénylnaphthalene, 11H-benzo(a)fluorene, 11H-benzo(b)fluorene et du 1H-Indene, 1-(phénylméthyle)- (non testé car non trouvé dans le commerce)

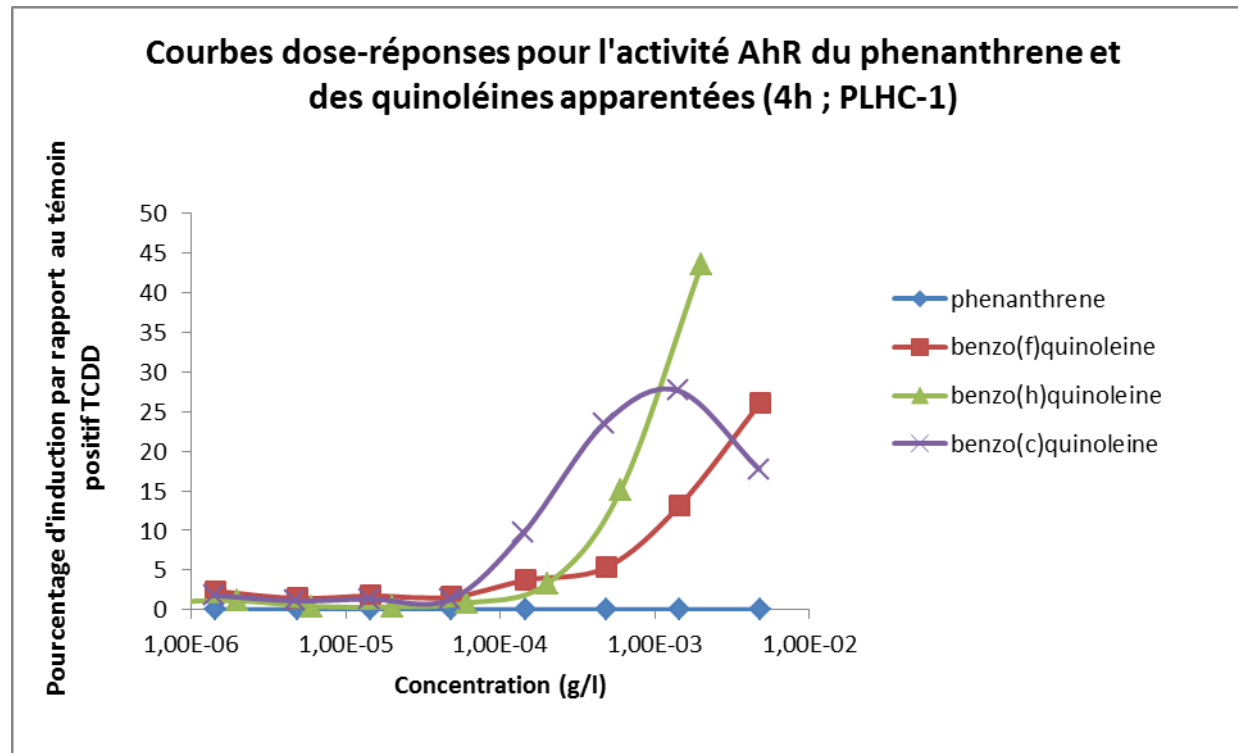
2-Phénylnaphthalene	11H-benzo(a)fluorene	11H-benzo(b)fluorene	1H-Indene, 1-(phénylméthyle)-
			

**Modélisation de l'activité AhR après 4h d'exposition des cellules PLHC-1 des molécules de la famille 1-phénylnaphthalene**

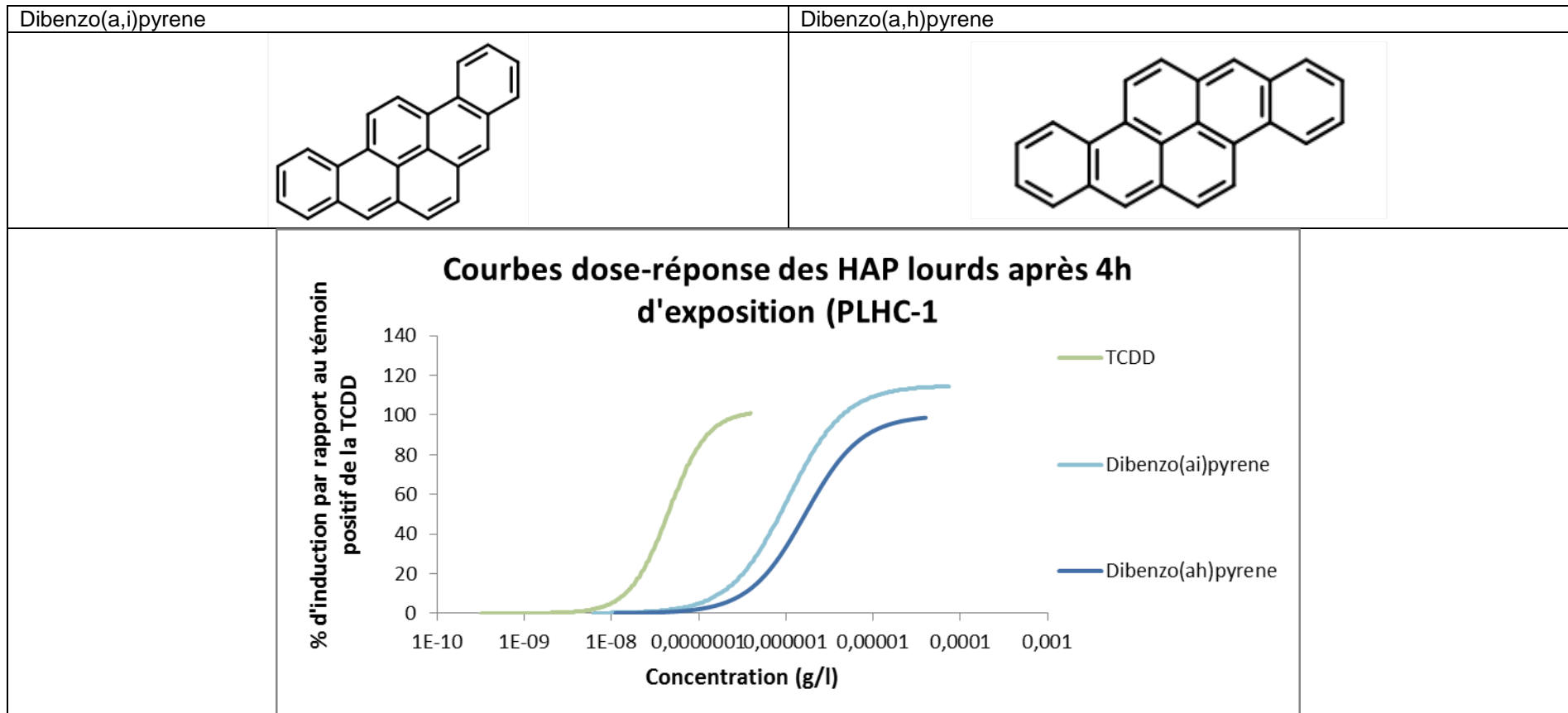


- Le phénanthrène et les quinoléines

Phenanthrene	Benzo(h)quinoleine	Benzo(f)quinoleine	Benzo(c)quinoleine
			

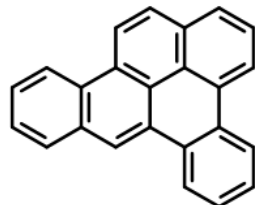


- Les HAP lourds

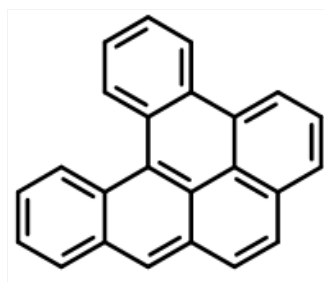


Deux autres HAP lourds ont été testés mais n'ont pas entraîné d'activité AhR. Il s'agit :

- Du dibenzo(a,e)pyrene :

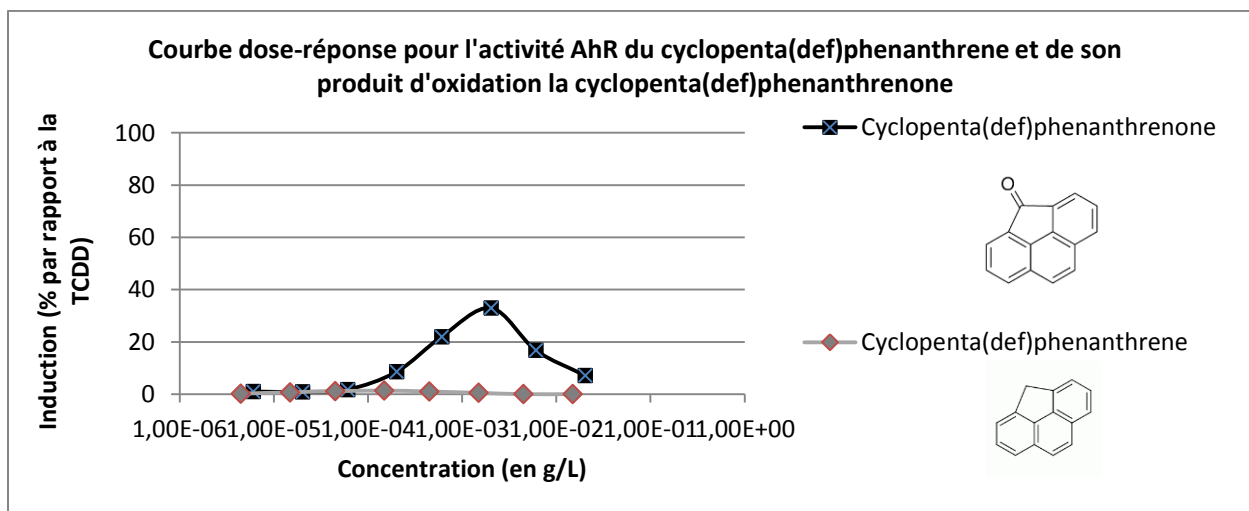


- Du Benzo(a,l)pyrene :

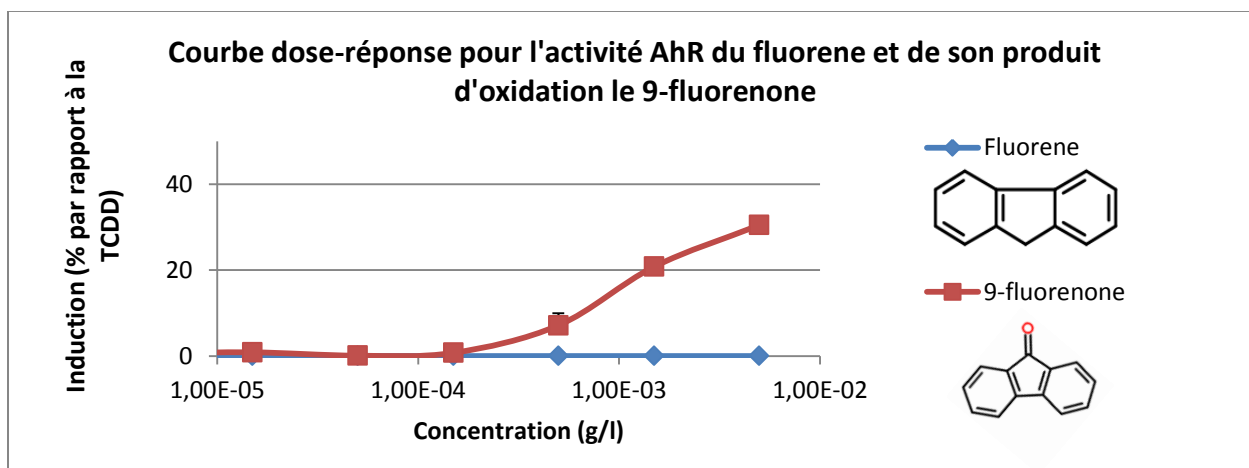


## Résultats des modélisations pour les molécules et leurs produits de dégradation

- Cyclopenta(def)phenanthrene et cyclopenta(def)phenanthrenone

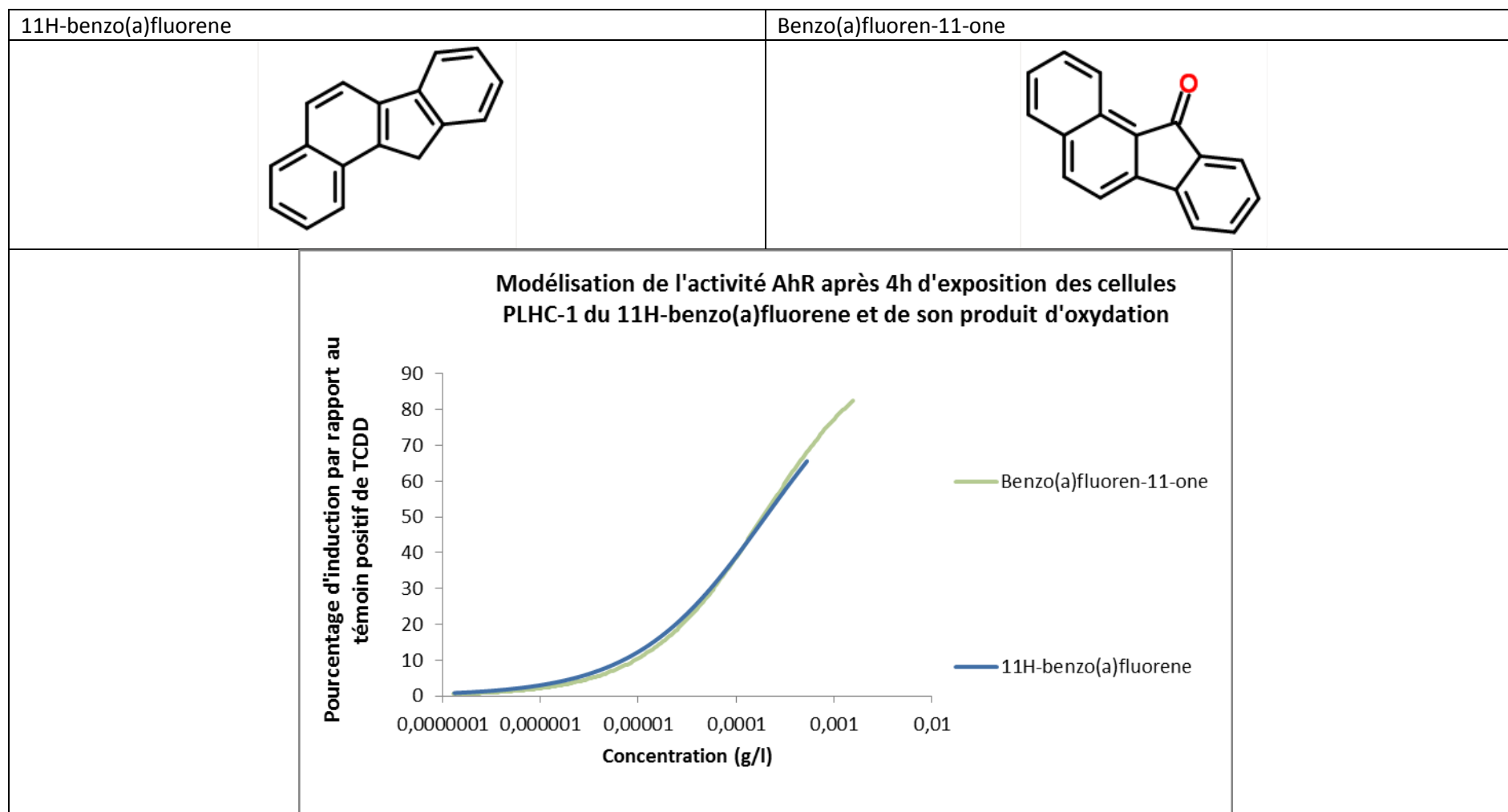


- Fluorene et 9-fluorenone





- 11H-benzo(a)fluorene et le Benzo(a)fluoren-11-one



**Annexe 4** : Prix des standards achetés durant ces travaux de thèse.

Description	n° CAS	concentration	solvant	quantité	tarif ht €
Benzo[b]naphtho[2,1-d]furane	239-30-5	200µg/mL	toluene	1 ml	319
2-Phenylnaphthalene	612-94-2	1000µg/mL	isooctane	1 ml	115
7H-Benzo[c]carbazole	205-25-4	200µg/mL	toluene	1 ml	198
11H-Benzo[a]carbazole	239-01-0	200µg/mL	toluene	1 ml	198
5H-Benzo[b]carbazole	243-28-7	200µg/mL	toluene	1 ml	319
9,10-Dihydroanthracene	613-31-0	1000µg/mL	isooctane	1 ml	66
Benzo[b]naphtho[2,3-d]furane	243-42-5	200µg/mL	toluene	1 ml	167
Benzo[b]naphtho[1,2-d]furane	205-39-0	200µg/mL	toluene	1 ml	319
11H-Benzo[a]fluorene	238-84-6	1000µg/mL	toluene	1 ml	273
9-Fluorenone	486-25-9	1000µg/mL	isooctane	1 ml	68
Benz[c]acridine	225-51-4	200µg/mL	toluene	1 ml	109
9,10-Anthraquinone	84-65-1	1000µg/mL	isooctane	1 ml	124
2-Methyl-9,10-anthraquinone	84-54-8	1000µg/mL	isooctane	1 ml	115
Benzo[a]fluoren-11-one	479-79-8	200µg/mL	toluene	1 ml	382
Benzanthrone	82-05-3	1000µg/mL	toluene	1 ml	107
5,12-Naphthacenequinone	1090-13-7	1000µg/mL	isooctane	1 ml	150
1,2-Benz[a]anthraquinone	2498-66-0	1000µg/mL	toluene	1 ml	128
Benzo[h]quinoline	230-27-3	200µg/mL	toluene	1 ml	62
Benzo[f]quinoline	85-02-9	1000µg/mL	toluene	1 ml	62
Benzo[c]quinoline	229-87-8	1000µg/mL	toluene	1 ml	51
4H-Cyclopenta[def]phenanthrene	203-64-5	500µg/mL	Isooctane	1 ml	163
4H-Cyclopenta[def]phenanthren-4-one	5737-13-3	1000µg/mL	Isooctane	1 ml	453
<b>Total ht €</b>					3948
<b>TVA 20%</b>					790
<b>Total TTC €</b>					4738

**Annexe 5** : Composés à activité AhR identifiés dans ces travaux et analysés en GC/MS.

Composé	Composés analysés en Scan (GC/MS)				
	Formule brute	Cas	Temps de rétention	Ion de quantification	Ion de confirmation
Naphthalene d8	C10D8	1146-65-2	13,12	136	Etalon interne
Benzo(h)quinoléine	C13H9N	230-27-3	21,92	179	178-151
9-fluorenone	C13H8O	486-25-9	26,84	180	152
Dibenzothiophene d8	C12D8S	33262-29-2	27,06	192	Etalon interne
Phenanthrene d10	C14D10	1517-22-2	27,6	188	Etalon interne
anthracene d10	C14D10	1719-06-8	27,83	188	Etalon interne
Benzo(c)quinoléine	C13H9N	229-87-8	28,61	179	178-152
Benzo(f)quinoléine	C13H9N	85-02-9	28,63	179	178-153
2-phenylnaphthalene	C16H12	35465-71-5	31,58	204	202
Cyclopenta(def)phenanthrenone	C15H8O	5737-13-3	32,89	204	176
Fluoranthene d10	C16D10	93951-69-0	33,11	212	Etalon interne
Benzo(b)naphtho(2,1-d)furane	C16H10O	239-30-5	34,29	218	189
Benzo(b)naphtho(1,2-d)furane	C16H10O	205-39-0	34,6	218	189
Benzo(b)naphtho(2,3-d)furane	C16H10O	243-42-5	34,87	218	189
11H-Benzo(a)Fluorene	C17H12	238-84-6	35,88	216	215
11H-Benzo(b)Fluorene	C17H12	30777-19-6	36,18	216	215
7H-Benzo(c)Fluorene	C17H12	30777-20-9	36,22	216	215
11H-benzo(a)fluorenone	C17H10O	479-79-8	38,21	230	200
Benzo(b)naphtho(2,1-d)thiophene	C16H10S	239-35-0	38,65	234	235
Benzo(c)acridine	C17H11N	225-51-4	39,018	229	228
Benzo(b)naphtho(1,2-d)thiophene	C16H10S	205-43-6	39,07	234	235
Benzo(b)naphtho(2,3-d)thiophene	C16H10S	243-46-9	39,42	234	235
Chrysene d12	C18D12	1719-03-5	39,84	240	Etalon interne
11H-Benzo(a)carbazole	C16H11N	239-01-0	40	217	216
5H-Benzo(b)carbazole	C16H11N	243-28-7	40,8	217	216
7H-Benzo(c)carbazole	C16H11N	205-25-4	41,04	217	216
1,2-Benzo(a)anthraquinone	C18H10O2	2498-66-0	41,92	258	202-230
5,12-Naphthacenequinone	C18H10O3	1090-13-7	43,12	258	202-231
Benzo(e)pyrene d12	C20D12	--	45,39	264	Etalon interne
Benzo(a)pyrene d12	C20D12	--	45,58	264	Etalon interne
Benzo(ghi)pyrene d12	C18D12	--	50,44	288	Etalon interne
Coronene d12	C24D12	16083-32-2	55,02	312	Etalon interne
Dibenzo(ai)pyrene	C24H14	191-30-0	55,65	302	303-151
Dibenzo(ah)pyrene	C24H14	189-64-0	55,82	302	303-152