

TECHNIQUES IMMUNO-ENZYMATIQUES APPLIQUÉES A L'ANALYSE DES SOLS POLLUÉS

Guillaume Pépin, Jean Bensoam, Michel Nomine*

Inéris

Les techniques immuno-enzymatiques se révèlent être un outil analytique complémentaire aux techniques d'analyses chimiques, permettant d'évaluer de façon rapide et semi-quantitative la contamination d'un sol. L'étude d'un site pollué par des PCB a permis de vérifier la qualité et la spécificité de la réponse en la comparant aux résultats de l'analyse chromatographique. Toutefois, l'utilisation juste et rigoureuse de ces techniques et une bonne interprétation des résultats nécessitent la connaissance précise du principe de la méthode, de son domaine d'application et de ses limites.

Immuno chemical methods reveal themselves as a complementary analytical tool to the standardized methods, allowing to assess quickly and in a semi-quantitative way the contamination of a soil. Here, the study of a PCB contaminated area enabled to determine its specificity and its quality through the comparison with a standardized technique. Nevertheless, a right and rigorous use and the interpretation of the results need an accurate knowledge of the method's principle, of its scope and limits.

INTRODUCTION

Les techniques de dosage immuno-enzymatique sont utilisées depuis de nombreuses années dans le domaine médical, pour détecter diverses molécules endogènes (ex : les hormones) ou exogènes (ex : les principes actifs). Plus récemment ce type de technique est appliqué au domaine de l'environnement pour offrir une alternative à l'analyse classique en laboratoire^{1,2,3}. En effet, le dosage immuno-enzymatique semble rapide, fiable, facile à mettre en œuvre et peu coûteux. Il possède un large domaine d'application (pesticides, composés organiques et inorganiques). Cependant le principe, relativement complexe, de la technique mise en œuvre et ses implications sont mal connus des principaux utilisateurs (bureaux d'études, société de dépollution, laboratoires...). L'apparente facilité d'utilisation de ces kits, le manque de formation des utilisateurs et la mauvaise maîtrise de la technique peuvent bien souvent conduire à leur

utilisation en dehors de leur domaine de validité, à une extrapolation abusive de leurs réponses et de leurs performances réelles et donc à des résultats erronés ou mal interprétés^{4,5}.

L'objet de cet article est de faire le point sur les performances des méthodes immuno-enzymatiques appliquées à l'environnement et plus particulièrement à l'analyse des sols pollués, d'identifier leurs avantages et leurs limites.

PRINCIPES DE LA MÉTHODE IMMUNO-ENZYMATIQUE

Principe de base^{6,7,10}

Les kits de dosage immuno-enzymatique de certains polluants dans l'environnement sont fondés sur la technique Elisa (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Celle-ci utilise la capacité des anticorps à mesurer spécifiquement la concentration d'une molécule ou d'une famille de molécules de structures très proches dans un mélange contenant d'autres contaminants. L'anticorps, immobilisé à la surface d'un solide, est mis en présence d'un mélange qui pourrait contenir l'analyte recherché, et d'un réactif qui contient un analogue de l'analyte, greffé à un marqueur (le conjugué enzymatique), introduit en quantité précise. Après compétition des différents composés du mélange vis à vis de l'anticorps, l'excès de molécules (analyte ou conjugué enzymatique) non fixées à la phase solide est éliminé par lavage. On utilise ensuite, par l'ajout d'un mélange substrat + chromogène, la réaction enzymatique qui va permettre de catalyser la transformation du chromogène en un produit coloré. La concentration du produit coloré est directement proportionnelle à la quantité de marqueur enzymatique et donc inversement proportionnelle à la concentration de l'analyte recherché. Elle se mesure par spectrophotométrie. On détermine la réponse ou l'intervalle de réponse vis-à-vis d'une gamme étalon. Le principe à retenir est « plus la couleur de l'échantillon est soutenue, moins l'échantillon est contaminé ».

Le principe de la méthode utilise deux réactions successives :

- Une réaction immunologique
- Une réaction enzymatique

Chaque type de réaction possède des caractéristiques et des spécificités différentes et la compréhension de ces deux mécanismes est indispensable pour appréhender de façon globale la technique de dosage.

Spécificité¹⁰

Que l'on souhaite doser un produit défini (par exemple un pesticide), ou bien un mélange de plusieurs produits (HAP, PCB...), les anticorps sont préparés pour réagir à une molécule-cible. Quoique la réaction soit très spécifique, des composés chimiques présentant des homologies de structure peuvent développer des affinités, variables, vis-à-vis des anticorps. Il est même possible d'établir une échelle d'affinité respective pour un certain nombre de composés similaires au composé-cible. Cette affinité est nommée « Réactivité croisée » ou « Cross Reactivity ».

Interférences potentielles^{2,3,4}

Le dosage peut être affecté par une substance présentant une interférence non-spécifique (inhibition du processus immunologique et/ou de la réaction enzymatique), si celle-ci est présente en forte concentration. Les principales substances interférentes sont les suivantes :

- Les anions : nitrate, thiosulfate, sulfite, sulfate, chlorure, silicate, phosphate.
- Les métaux : cuivre, nickel, fer, ions mercurique, manganèse, zinc.
- Les cations : magnésium, calcium.
- Autres : les acides humiques.

Faux positifs - faux négatifs

Si la réaction immunologique n'a pas eu lieu avec l'analyte présent en solution, on obtient un faux négatif. C'est le cas pour une famille de produits n'ayant pas une affinité très grande avec l'anticorps. L'instabilité du conjugué enzymatique ou la présence d'interférents bloquant la réaction enzymatique peut donner lieu à des faux positifs.

APPLICATION À L'ANALYSE DES SOLS

Méthode de dosage^{6,7,8,9}

Chaque fournisseur de kit propose une gamme spécifique de matériels et de produits consommables pour couvrir les 4 étapes suivantes :

1. Collecte de l'échantillon : Cette étape primordiale consiste en la réalisation d'une prise d'essai d'une dizaine de grammes. La représentativité de celle-ci sera liée directement au degré d'hétérogénéité du sol. Il convient d'apporter un grand soin dans sa réalisation.

2. Extraction de l'échantillon : Les kits d'extraction proposent des fioles permettant une agitation manuelle à température ambiante parfois facilitée par la présence de billes métalliques permettant une meilleure mise en contact de la prise d'essai avec l'extractant. Celui-ci est un solvant (métha-

nol dans le cas du dosage des HAP et des PCB), auquel sont parfois adjoints des agents tensioactifs permettant une meilleure dispersion du sol dans le milieu ou des solutions tampons permettant une meilleure extraction en fixant un pH adéquat. Des facteurs comme la granulométrie du sol, sa teneur en argile, sa porosité, sa compacité et sa teneur en eau vont influencer notablement la facilité d'extraction du polluant.

3. Dilution de l'extrait : Les kits du commerce sont adaptés pour diverses applications. Suivant leur conception, ils offrent des seuils de détection allant de 1 ppm à 0,1 ppb. Lorsque qu'on extrait un sol susceptible d'être fortement contaminé, une dilution importante est incontournable pour que le mélange à doser possède une concentration mesurable dans la plage déterminée par les solutions de calibration.

Pour les kits offrant de très faibles seuils de détection, une dilution adéquate peut nécessiter plusieurs étapes (de 1000 ppm à 1 ppb : dilution de 1 000 000). Ceci multiplie les risques d'erreurs potentiels.

4. Dosage de la substance par réaction immuno-enzymatique : Bien que chaque fabricant développe une spécificité particulière pour l'emploi de son kit, sur un plan fondamental le principe est toujours le même.

Interprétation des résultats

L'interprétation des résultats s'avère être un des points-clés de l'utilisation correcte des kits immuno-enzymatiques. Il existe deux façons d'interpréter les résultats : l'une en utilisant une fourchette de concentration, l'autre en donnant un résultat numérique.

Détermination d'une fourchette et raisonnement par rapport à un seuil

Cette méthode utilise l'emploi de deux calibrateurs ou plus (solutions étalons) distants d'un intervalle suffisamment significatif (par ex. 10 - 100 - 1000 ppm). La réponse calculée pour l'échantillon permet de situer l'échantillon par rapport aux calibrateurs.

Dans le cas fréquent de deux calibrateurs (C1 ; C2 ; C1 < C2), on a 3 possibilités : inférieur à C1, compris entre C1 et C2, supérieur à C2. Ceci permet donc de travailler avec des seuils de manière semi-quantitative.

Détermination d'une valeur quantitative pour la contamination

Cette méthode exige l'emploi de trois calibrateurs au minimum. La réponse exprimée pour chaque calibrateur permet, après transformation des variables, de tracer une droite d'étalonnage. La réponse donnée par l'échantillon est quantifiée à l'aide de cette courbe. Bien que fournissant une évaluation chiffrée de la contamination, il existe un danger dans la démarche qui consiste à exprimer les résultats sous forme d'une valeur précise qui masque les incertitudes liées à la spécificité de réponse des kits, à la composition complexe des pollutions et au rendement d'extraction. Ce test ne donne pas non plus d'informations sur la composition du mélange

de polluants dans l'échantillon testé. L'opérateur et a fortiori les utilisateurs des résultats analytiques doivent impérativement garder à l'esprit que la valeur obtenue n'est qu'un indice de la contamination, un ordre de grandeur qui ne peut être utilisé comme valeur certifiée.

Nécessité d'un calage vis-à-vis d'une méthode d'analyse classique

L'éventualité de faux positifs ou négatifs, les problèmes potentiels liés à l'extraction, à la spécificité des anticorps et à l'étalonnage imposent d'envisager systématiquement une analyse comparative, pour un certain nombre d'échantillons pris dans un lot, par les méthodes normalisées (extraction en laboratoire suivi d'une chromatographie (GC ou HPLC) couplée au détecteur adéquat). Ce type d'analyse permettra de mieux caler les résultats obtenus vis-à-vis de la contamination réelle de l'échantillon et de détecter les faux négatifs ou positifs. Cette vérification se fera de préférence pour des échantillons indiquant une contamination nulle et pour ceux situés à proximité des bornes inférieures et supérieures du domaine de dosage. Le nombre de vérifications sera déterminé en fonction de la complexité de la matrice des sols ainsi que de la nature du polluant à doser.

ÉTUDE D'UN CAS CONCRET DE POLLUTION PAR DES PCB

Présentation du cas d'étude

Le site choisi pour conduire l'expérimentation des kits est un site industriel. L'origine de la pollution est un ancien atelier de récupération de métaux où ont été notamment démantelés de nombreux transformateurs électriques. Diverses structures facilitant le ruissellement (canalisations et caniveaux) ont causé l'extension de la contamination aux parcelles mitoyennes de l'atelier. Ces parcelles sont constituées de concessions agricoles et de jardins privés. L'intérêt de ce site est qu'il présente une géologie et une pédologie très diversifiées. Les échantillons prélevés sur site à diverses profondeurs présentent des matrices différentes avec des contaminations graduelles.

Matériels et réactifs⁶

Dosage immuno-enzymatique

Kit de prélèvement de sol (Soil collection Kit) RaPID PREPTM de marque Ohmicron
 Kit d'extraction d'échantillon (Sample extraction Kit) RaPID PREPTM de marque Ohmicron
 Kit de dosage Immuno-enzymatique spécifique au dosage des PCB (PCBs RaPID Assay) de marque Ohmicron
 Pipettes de précision Mircoman M25 à déplacement positif de marque Gilson
 Pipette de distribution de marque Eppendorf et embouts Combitips Eppendorf
 Dosage par méthode chromatographique
 Extraction au soxhlet à l'hexane pestipur de marque SDS.

Chromatographe Varian 3400 muni d'un détecteur à capture d'électrons et d'un passeur automatique d'échantillon.
 Colonne capillaire « Methyl Silicone » de 25 mètres, de diamètre interne 0,32 mm à film mince (0,12 μm).
 Étalonnage externe par un mélange d'Arochlor 1260.

Organisation de l'essai

L'essai mené à été organisé de la façon suivante : 9 échantillons de sols présentant des matrices différentes et des contaminations graduelles ont été sélectionnés. Ces échantillons ont été homogénéisés puis divisés en deux sous-échantillons. L'un des sous-échantillons est destiné à subir une procédure classique d'extraction puis de dosage par chromatographie, l'autre est destiné à subir un dosage par test immuno-enzymatique.

Sous échantillon destiné à la chromatographie

La contamination a été quantifiée, suivant le projet de norme ISO CD 10382.2, de la façon suivante :

- Séchage préalable à l'étuve pendant 24 heures à 40°C.
- Extraction au soxhlet à l'hexane pendant 16 heures.
- Dosage par couplage CG/ECD.
- Détermination du taux de matière sèche (séchage à 105°C pendant 24 Heures).

Sous échantillon destiné aux dosages immuno-enzymatiques

Mode opératoire :

- Aucun prétraitement n'a été réalisé sur les sols.
- Pesée de 10 grammes +/- 0,1 g de sol à l'aide du kit de prélèvement de sols.
- Extraction manuelle (Kit d'extraction) avec une solution d'extraction spécifique* pendant 5 minutes selon le mode opératoire prescrit par le fournisseur ; obtention d'un extrait.
- Préparation de 3 diluats avec une solution commerciale spécifique de dilution* (Kit d'extraction).
- Application du dosage immuno-enzymatique suivant les spécifications du fournisseur en utilisant le kit de dosage.

* La composition de ces solutions est gardée secrète par le fabricant. Toutefois, celui-ci précise que le solvant de base est le méthanol

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Cinq campagnes d'analyse des neuf échantillons ont été réalisées, soit quarante cinq mesures. Les trois premières campagnes avaient pour but d'évaluer la qualité de la réponse des kits dans des conditions de travail idéales. Les deux suivantes ont permis d'étudier l'influence du fractionnement de l'utilisation d'un kit. En effet, il est possible d'utiliser un kit de x unités en n campagnes de x/n tests. L'ensemble des réactifs du kit subissent alors n cycles de réchauffage de la température de conservation (4°C) à la température ambiante du laboratoire (20°C) puis diverses manipulations (ouverture des flacons, agitation, pipetage) avec la possibilité d'évaporer notamment une partie du solvant (méthanol) des étalons de la substance à doser.

Les campagnes 1, 2 et 3 ont été réalisées respectivement

après 0, 1 et 2 cycles de manipulation et de réchauffage à température ambiante (20°C) puis restockage à 4°C. Le kit a ensuite été stocké 15 jours en chambre froide à 4°C. Les campagnes 4 et 5 ont été réalisées respectivement après 3 et 4 cycles de réchauffage à température ambiante (20°C), manipulation, puis restockage à 4°C. Les résultats sont rassemblés dans les tableaux I et II.

Tableau I : Teneur en P.C.B. des échantillons de sols (campagnes 1 à 3)

N° de campagne	Teneur déterminée par chromatogramme en mg/kg sec	Estimation par rapport aux standards en mg/kg sec	Teneur calculée en mg/kg sec
1	2,11	5 < X < 20	11
		5 < X < 20	9
		5 < X < 20	9
1	15,6	5 < X < 20	26
		5 < X < 20	26
		5 < X < 20	31
1	59,9	20 < X < 100	76
		20 < X < 100	84
		20 < X < 100	76
2	0,8	2 < X < 10	4,7
		2 < X < 10	4,2
		2 < X < 10	0,5
2	0,3	X ≈ 0,5	0,5
		X ≈ 0,5	0,4
		X ≈ 0,5	0,4
2	0,1	X < 0,5	0,2
		X < 0,5	0,3
		X < 0,5	0,3
3	363	200 < X < 1000	360
		200 < X < 1000	405
		200 < X < 1000	360
3	1657	X > 1000	1957
		X > 1000	1631
		X > 1000	1849
3	8554	X > 1000	> 2630
		X > 1000	> 2630
		X > 1000	> 2630

Les graphiques 1 et 2 illustrent l'ensemble des résultats obtenus sur l'ensemble de la plage de contamination traitée (0,1 à 10000 mg/kg sec). Les résultats sont présentés avec des échelles logarithmiques (graphe 1) et linéaires (graphe 2). L'échelle logarithmique donnant une représentation intuitive du caractère semi-quantitatif, la représentation linéaire permettant d'évaluer quantitativement la corrélation entre les résultats des tests immuno-enzymatiques et ceux obtenus par chromatographie.

Les résultats obtenus permettent de vérifier sur un cas concret la qualité de la réponse semi-quantitative dans le cas de la caractérisation d'une pollution par des PCB sur diverses matrices de sol de composition hétérogène et contaminées de façon graduelle. La corrélation avec les résultats fournis par l'analyse par chromatographie est très bonne en terme semi-quantitatif. L'indice de corrélation sur les trois premières campagnes est de 1,11 et sur les 45 mesures réalisées, aucune n'a montré de réponse aberrante en terme semi-quantitatif (différence supérieure à un ordre de grandeur (facteur

Tableau 2 : Teneur en PCB des échantillons de sols (campagnes 4 et 5)

N° de campagne	Teneur déterminée par chromatogramme	Estimation par rapport aux standards	Teneur calculée en mg/kg sec
4	2,11	0 < X < 5	1,6
		0 < X < 5	1,1
		0 < X < 5	1,1
4	15,6	X ≈ 20	25,8
		X ≈ 20	23,5
		X ≈ 20	28,2
		X > 100	221
4	59,9	X > 100	226
		X > 100	163
		X ≈ 0,5	0,8
5	0,8	X ≈ 0,5	0,3
		X ≈ 0,5	0,7
		X < 0,5	nd
5	0,3	X < 0,5	0,0
		X < 0,5	nd
		X = 0	0,0
5	0,1	X = 0	nd
		X = 0	nd
		X = 0	nd

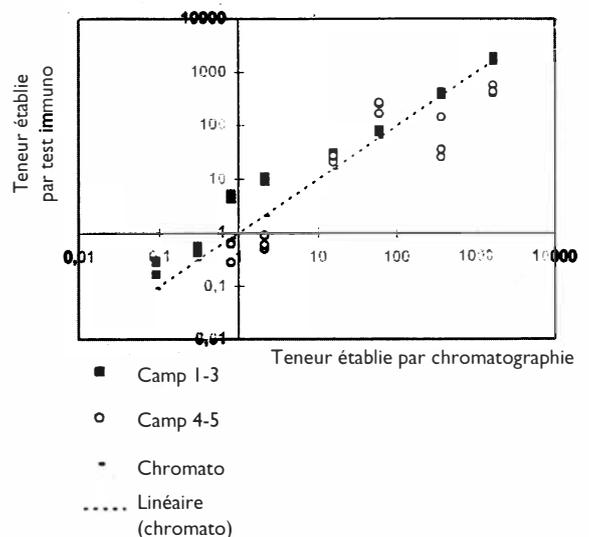


Figure 1 : Corrélation entre la valeur établie par test immuno-enzymatique et celle établie par chromatographie (échelle logarithmique)

10)). Les réponses moins précises des campagnes 4 et 5 démontrent la sensibilité des kits au cycle d'utilisation (température ambiante) et de stockage (basse température) et à l'altération des produits (étalons et conjugué enzymatique).

CONCLUSION

Il est certain que les kits immuno-enzymatiques ont une place importante à prendre dans le domaine de l'analyse appliquée à l'environnement. Leurs concepteurs travaillent sans cesse à étendre leurs champs d'application en développant leur adaptation au terrain, leur précision ainsi que le nombre et la nature des espèces chimiques et des mélanges dosés. Il est primordial de saisir les opportunités que nous offre cette technique prometteuse mais nous devons rester vigilants sur les performances réelles de ces différents kits

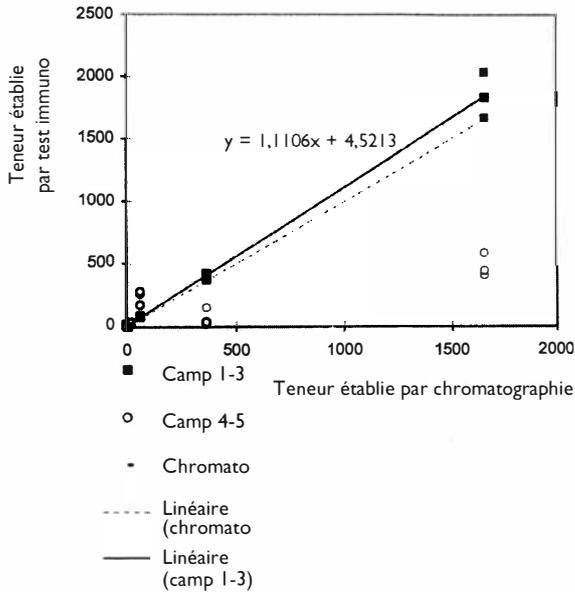


Figure 2 : Corrélation entre la valeur établie par test immuno-enzymatique et celle établie par chromatographie (échelle linéaire)

et veiller à tempérer l'enthousiasme croissant pour ce type de techniques en mettant l'accent sur leurs spécificités réelles et leurs domaines d'application.

Nous avons pu vérifier sur un cas concret de pollution par les PCB, la spécificité des techniques immuno-enzymatiques et la qualité de la réponse semi-quantitative qu'ils permettent d'obtenir de manière rapide et peu coûteuse. L'étude comparative vis-à-vis des techniques chromatographiques traditionnelles nous a montré l'intérêt de ces kits en terme d'estimation semi-quantitative et leurs limites lorsque l'on souhaite une réponse réellement quantitative. Ces limites sont déterminées d'une part par le fondement même de la méthode de dosage (spécificité des anticorps vis à vis du mélange, conditions réactionnelles, composition des standards de calibration, expression en un terme global pour un mélange de composés...), et d'autre part par la mise en œuvre pratique de l'essai (échantillonnage, extraction, dilution).

Les résultats obtenus lors de cette étude nous montrent que la technique de dosage immuno-enzymatique ne doit pas être considérée comme une technique alternative aux techniques d'analyse classique par chromatographie, mais comme une technique complémentaire avec son champ d'application particulier.

PERSPECTIVES

Les trois champs d'application qui semblent les mieux adaptés aux kits immuno-enzymatiques sont :

- Le diagnostic de terrain
- Le screening d'échantillons
- Le suivi de dépollution

Dans le premier cas, les kits permettent de diminuer le coût d'un pré-diagnostic en multipliant le nombre de points

d'investigation. Au sens de la démarche initiée par le ministère de l'Environnement pour la gestion des sites potentiellement pollués, le pré-diagnostic a pour but la recherche d'indices de pollution. Les kits prennent ici toute leur dimension. En multipliant à faible coût le nombre de points d'investigation, ils permettent de resserrer les maillages d'échantillonnage, de mieux cibler les zones contaminées et d'affiner les cartographies de sites pollués. Dans le second cas, les kits permettent de pré-sélectionner un nombre restreint d'échantillons qui doivent subir des analyses plus coûteuses. L'analyse gagne en pertinence. Dans le troisième cas, on peut suivre un chantier de dépollution au jour le jour et ne recourir aux analyses par chromatographie que lorsque le seuil de dépollution semble atteint. Le gain en coût et en temps peut être très important.

* **Guillaume Pépin, Jean Bensoam, Michel Nominé**
Institut de l'environnement industriel et des risques (Inéris) - Parc technologique Alata - BP 2 - 60550 Verneuil-en-Halatte

Bibliographie

1. *Antibodies : Analytical tools to study environmentally important compounds* Helen Van Vunakis in *Immunochemical methods for Environmental Analysis*, J.M. Van Emon, R.O. Mumma, ACS Symposium Series 442, 1990.
2. *Immunochemical technology in environmental analysis : Addressing critical problems* Bruce D ; Hammock in *Immunochemical methods for Environmental Analysis*, J.M. Van Emon, R.O. Mumma, ACS Symposium Series 442, 1990.
3. *Barriers to adopting immunoassays in the pesticide analytical laboratory*, James N.Seiber, Quing Xiao Li, in *Immunochemical methods for Environmental Analysis*, J.M. Van Emon, R.O. Mumma, ACS Symposium Series 442, 1990.
4. *Immunoassays Methodes EPA evaluations*, J.M. Van Emon, in *Immunochemical methods for Environmental Analysis*, J.M. Van Emon, R.O. Mumma, ACS Symposium Series 442, 1990.
5. *A status report on Field-portable immunoassay*, Jeanette M.Van Emon Clare, L.Gerlach, in *Environmental Science and technology*, Vol 29, n°7,1995.
6. *PCBs Rapid Assay*, final notice of certification, certification program (AB2060) for hazardous waste environmental technologies, Departement of toxic substance control, California Regulatory Notice Register N° 35-Z, september 1994.
7. *Quantitative determination of PCBs in soil and Water by a magnetic particle-base Immuno-assay*, F.M. Rubio, *Environnemental science and technology* vol 30, N°2, p 695-700 1996.
8. *Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil and water by a magnetic particle-based enzyme immunoassay system*, F.M. Rubio, *Proceedings of the Fourth International Symposium on field screening methods for hazardous wastes and toxic chemicals*, Tropicana Hotel, Las Vegas, Nevada, february 22-24, 1995.
9. *Field study of immunoassay screening methods for BTEX, PAHs, and PCB's at a former coal gasification facility*. R. Schulte et K.Olinger, CHMM ; Delaware Department of Natural Resources and environmental Control, Superfund Branch.
10. *Quantitative enzyme-Linked Immunosorbent assay for determination of polychlorinated biphenyls in environmental soil and sediment samples*. J.C. Johnson and J.M. Van Emon, *analytical chemistry*, vol 68, N° 1, january 1, 1996.