Nancy-Université
INPL

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.
Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur au même titre que sa version papier. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.
D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite entraîne une poursuite pénale.

Contact SCD INPL: mailto:scdinpl@inpl-nancy.fr

LIENS

Code de la propriété intellectuelle. Articles L 122.4
Code de la propriété intellectuelle. Articles L 335.2 – L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Institut National Polytechnique de Lorraine
Ecole Doctorale Ressources, Procédés, Produits et Environnement
Laboratoire Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux (URAFPA)

THESE :

Présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur de l'INPL

Spécialité : Sciences Agronomiques

Validation d'un test de mesure de bioaccessibilité

Application à 4 éléments traces métalliques dans les sols : As, Cd, Pb et Sb

Par
Julien Caboche

Soutenue publiquement le 28 septembre 2009 devant le jury composé de :

Président	**Guillaume Echevarria,** Professeur, ENSAIA, Vandœuvre-lès-Nancy
Rapporteurs	**Pierre-Marie Badot,** Professeur, Université de Franche-Comté
	Mark Cave, Responsable Unité de Recherches, British Geological Survey, Nottingham (UK)
Examinateurs	**Francis Douay,** Professeur, ISA, Lille
	Cyril Feidt, Professeur, ENSAIA, Vandœuvre-lès-Nancy (Directeur de thèse)
	Sébastien Denys, Ingénieur de recherches, INERIS, Verneuil-en-Halatte (Co-directeur de thèse)
Invité	**Franck Marot,** Ingénieur sites et sols pollués, ADEME

Remerciements

Ce projet a bénéficié du soutien financier de l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie et du Ministère de l'Ecologie, de l'Energie, du Développement Durable et de l'Aménagement du Territoire.
Ce travail de thèse réalisé à la fois à l'INERIS (Institut National de l'Environnement et des Risques) et au laboratoire URAFPA (Unité de Recherche Animal et Fonctionnalité des Produits Animaux), a été l'occasion de rencontres très enrichissantes sur le plan scientifique et professionnel comme sur le plan personnel.
Premièrement, merci à Jacques Bureau et Olivier Aguerre-Chariol de m'avoir accueilli au sein de leur unité. De même, un grand merci à Guido Rychen de m'avoir accueilli au sein du laboratoire URAFPA, d'avoir participé aux premières réflexions sur le projet et de m'avoir chaleureusement reçu lors de mes différents passages à Nancy.
Merci à Sébastien Denys et Karine Tack d'avoir monté ce projet de thèse entre l'URAFPA et l'INERIS et de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce projet dans de très bonnes conditions et d'y venir à bout. Merci à Cyril Feidt de m'avoir encadré, soutenu et de m'avoir donné l'opportunité de réaliser les expériences *in vivo* à l'ENSAIA même si au début ce n'était pas gagné. J'ai toujours apprécié de travailler à vos côtés à la fois pour m'avoir guidé tout au long du projet mais également pour les bons moments passés durant la thèse.
Je suis très reconnaissant à Monsieur le Professeur Guillaume Echevarria (ENSAIA de Nancy, Laboratoire Sols et Environnement) de me faire l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse. Je suis particulièrement honoré que Messieurs le Professeur Pierre-Marie Badot (Université de Franche-Comté, Laboratoire Chrono-environnement CNRS) et Monsieur Mark Cave (Responsable de recherche au British Geological Survey) ont accepté d'examiner mes travaux de thèse, et d'en être les rapporteurs. Je remercie également Monsieur Francis Douay (ISA de Lille, Laboratoire Sols et Environnement) d'avoir accepté de juger ce travail et de participer au jury. Mes remerciements vont aussi à Monsieur Franck Marot (ADEME) pour avoir suivi l'avancement du projet et d'avoir accepté de participer au jury.

Merci aux membres du comité de pilotage et aux membres du groupe BARGE qui m'ont accompagné dans ma démarche scientifique, pour les discussions constructives et les conseils qui ont permis la bonne réalisation du projet.

Merci à de nombreuses personnes de l'INERIS qui m'ont permis d'évoluer dans de très bonnes conditions. En premier lieu, un très grand merci à mes différents collègues de chimie inorganique de m'avoir formé et aidé pour l'ensemble des analyses. Maintenant à vous de

jouer et de devenir les rois et reines de la bioaccessibilité. Une grande pensée aux amis du café pour leur soutien et grâce auxquels le travail s'est effectué dans la bonne humeur : Valérie, Cynthia, Bernadette, Marie-José, Nathalie, Julia, Siv, Emmanuelle, Laurent, Hervé, Eric, Basile. Merci d'avoir fait du laboratoire un lieu de convivialité et de bonne humeur. Valérie, je te promets de m'entraîner pour le R&B de Fleurine 2010. Un grand merci également à tous les autres membres des équipes résa et nova et notamment : Claudine, Jérôme, Arnaud, Hervé, Olivier, Sylvain et Nicolas. Patrice je te remercie pour ton aide lors des nombreuses manipulations de spéciation physique. Merci également à Cécile, Marie et Sophie pour leur disponibilité et leur rapidité lorsque j'apportais mes OM en dernière minute... Finalement, une pensée pour les collègues et équipiers du foot…Que de bon moments passés avec vous que ce soit le midi ou lors du tournoi annuel….Cynthia je compte sur toi pour motiver les troupes pour l'année prochaine afin de défendre notre titre de champion.

Une grande partie de la thèse s'est déroulée au sein du laboratoire de l'URAFPA de Nancy. Je remercie toute l'équipe de m'avoir aussi bien accueilli lors de chacun de mes passages plus ou moins longs. Merci pour l'aide technique, le soutien moral et les bons conseils scientifiques et autres…que j'ai reçu. Un grand MERCI à toutes les personnes qui ont participé à l'expérimentation *in vivo* et sans qui ce projet n'aurait pu aboutir. Je pense en particulier à Héléna, Paméla, François, Faycal, Hervé, Cyril, Guido, Agnès, Anael, Angélique et Stephan. Un merci particulièrement à Catherine Jondreville pour m'avoir formé aux analyses statistiques. Merci beaucoup pour ta rigueur, le temps que tu m'as consacré, l'aide précieuse que tu m'as apportée pour toute la démarche méthodologique. Je souhaite également remercier ceux qui ont pu croiser ma route au laboratoire, je pense particulièrement à Abir, Christine, Claire, Aude, Julie, Servane, Marie-antoinette, Fanny, abdou, David, Yves, Yann et bien entendu un grand merci à la Cath.

Une pensée particulière à mes collègues thésards et amis du bureau A14 : AGNES, ANGELIQUE, ANAEL et FAYCAL. Merci pour votre accueil lors de mes différentes venues, merci pour les très bons moments passés à vos côtés, merci pour votre soutien. Je vous soutiendrez également jusqu'à la fin et j'espère passer encore de nombreux bons moments en votre compagnie et vous êtes bien sûr les bienvenus dans le NORD….

Un grand merci à ma famille et ma belle-famille et amis pour m'avoir soutenu pendant ces années et pour avoir toujours été très présents et réconfortants. Sans vous, cette aventure n'aurait pas été possible. A Valérie, tout mon amour. MERCI pour tes encouragements, pour tout ce que tu as supporté pendant cette aventure et merci pour tout ce que tu m'apportes.

Résumé

La gestion des sites et sols pollués repose sur l'évaluation des expositions aux contaminants. Le retour d'expérience montre que les voies d'exposition directe, et notamment l'ingestion de terre pour les enfants, engendrent les niveaux de risque les plus élevés. Actuellement, en se basant sur la concentration totale d'un polluant dans le sol, l'évaluation des risques tend à être surprotectrice dans la mesure où seule une fraction de la substance peut pénétrer à l'intérieur de l'organisme. L'objectif de l'étude est de mettre en évidence que le test *in vitro* UBM (Unified Barge Method) de bioaccessibilité est pertinent pour estimer la fraction biodisponible des ETM dans les sols. Pour cela, il est nécessaire de démontrer que la solubilisation des contaminants dans le tractus gastro-intestinal est une étape limitante dans le processus de biodisponibilité et d'autre part que les mesures de bioaccessibilité sont corrélées aux mesures de biodisponibilité. Pour 15 sols sélectionnés sur trois sites contaminés différents, l'étude montre que la biodisponibilité est très variable pour le plomb (8% à 82%), le cadmium (12% à 91%) et l'arsenic (3% à 78%). Pour l'antimoine, les valeurs de biodisponibilité relative et de bioaccessibilité sont très faibles indépendamment des caractéristiques contrastées des sols (valeurs < 20%). De ce fait, ces conditions ne permettent pas de valider le test *in vitro* pour l'antimoine. Les résultats des corrélations, pour les trois autres contaminants, démontrent que la bioaccessibilité est l'étape limitante de la biodisponibilité et que le test UBM est pertinent pour estimer la bioaccessibilité de ces éléments dans les sols. Notre étude met également en évidence l'impact de la matrice sol sur les variations des valeurs de bioaccessibilité. Ainsi, il a été montré que la distribution des contaminants sur les différentes phases porteuses du sol est un paramètre majeur et robuste pour expliquer les variations de la bioaccessibilité pour l'ensemble des sols étudiés. Les résultats de l'étude mettent en lumière que le test *in vitro* UBM peut fournir une alternative possible aux investigations *in vivo* afin d'affiner les niveaux d'exposition des ETM suite à l'ingestion de sol.

Mots clés : biodisponibilité relative, bioaccessibilité, éléments métalliques, ingestion, sol, validation

Abstract

The management of contaminated soil is based on the assessment of exposure of pollutants. The review shows that the direct routes of exposure, including soil ingestion for children, generate the highest risk levels. Currently, based on the total pollutant concentration in soil, risk assessment tends to be overestimate because only a fraction of the substance may penetrate into the body. The aim of the study is to demonstrate that *in vitro* UBM test (Unified Method Barge) is relevant to estimate the bioavailable fraction of metals in the soil by estimating the bioaccessible fraction. For this, it is necessary to show that the solubilization of contaminants in the gastrointestinal tract is a limiting step in oral bioavailability process and that bioaccessibility is correlated to bioavailability. For 15 soils selected on three different sites, the study shows that bioavailability is highly variable for lead (8% to 82%), cadmium (12% to 91%) and arsenic (3 % to 78%). For antimony, the relative bioavailability and bioaccessibility values are very low independently of the different soil characteristics (values <20%). Thus, these conditions do not allow to validate *in vitro* test for antimony. The results of correlations, for the three other contaminants, show that bioaccessibility is the limiting step in the bioavailability process and that UBM test is relevant to estimate the bioaccessibility. Our study also highlights the impact of the soil matrix on the variation of bioaccessibility values. Thus, it was shown that the distribution of contaminants in the different bearing phases of soil is a major and robust parameter to explain the variations of bioaccessibility for all soils studied. The results of the study highlight that the *in vitro* UBM test is a promising alternative to *in vivo* investigations to measure the exposure levels of metals after soil ingestion.

Keywords : Relative bioavailability, bioaccessibility, metals, ingestion, soil, validation

Valorisation scientifique des travaux

PUBLICATIONS

- Denys S., **Caboche J.**, Tack K., Delalain P. Bioaccessibility of lead in high carbonate soils, *Journal of Environmental Science and Health Part A*, **2007**, 42, 1331-1339.

- Denys S., **Caboche J.**, Tack K., Delalain P. Solid Phase Distribution, Bioaccessibility and Speciation of Sb in Soils and in Digestive Fluids. *Chemosphere*, **2008**, 75(5), 711-716

- **Caboche J.**, Jondreville C., Tack K., Denys S., Rychen G, Feidt C. Tissue Distribution of Sb in piglets orally given graded levels of Sb (V). *Toxicology and Environmental Chemistry*, **2009**, 91, 267-278

- **Caboche J.**, Feidt C., Denys S., Delalain P., Tack K. Rychen G. Speciation and bioaccessibility of lead in soils contaminated by mining and smelting activities. (à soumettre)

- Denys S., **Caboche J.**, Feidt C., Hazebrouck B., Dor F., Dabin C., Tack K. Biodisponibilité et bioaccessibilité des métaux et métalloïdes pour la voie orale : définition, prise en compte en évaluation du risque et retour d'expérience international. *Environnement Risque et Santé*, **2009** (*acceptée, en presse*).

COMMUNICATIONS ORALES

- Denys S., **Caboche J.**, Tack K, Delalain P. Assessing metals bioaccessibility to Man in human health risk assessment of contaminated sites. Oral presentation in Difpolmine conference, 12-13 December **2006**, Montpellier, France.

- Denys S., **Caboche J.**, Tack K. Antimony soils speciation related to its bioaccessibility to man. Oral presentation in 4th International workshop "Bioavailability of pollutants and soil remediation", 10-13 September **2006**, Seville, Spain.

- **Caboche J.,** Feidt C., Denys S., Tack K., Raoul C., Dor F., Dab W. Study of the variation in As bioaccessibility by speciation and soil properties. Oral presentation in 18th annual meeting SETAC, 23-28 may **2008**, Warsaw, Poland.

- **Caboche J.**, Denys S., Tack K., Feidt C. Bioaccessibility and speciation of As and Pb in soils contaminated by two distinct anthropic activities. Oral presentation Consoil, 3-6 june **2008**, Milan, Italia.

- **Caboche J.**, Feidt C., Tack K., Denys S. In vivo validation of the Unified Barge Method for the bioavailability of As, Cd and Pb in soils. Invited conference for oral presentation in Medical Geology conference at BGS, 19-20 March **2009**, Nottingham, UK.

- **Caboche J.**, Denys S., Tack K., Jondreville C., Rychen G., Feidt C. Accuracy of the Unified Barge Method to estimate Arsenic bioavailability in contaminated soils. Oral presentation in 19th annual meeting SETAC, 31 May-4 June **2009**, Göteborg, Sweden.

- Feidt C., Denys S., Floch-Barneaud A., **Caboche J.**, Dor F., Dabin C., Tack K. Biodisponibilité des polluants du sol: définition, caractérisation et utilisation dans la gestion des sites et sols pollués. Présentation orale, deuxièmes rencontres nationales de la Recherche sur les sites et sols pollués : pollutions locales et diffuses, Paris, les 20 et 21 octobre **2009**.

COMMUNICATIONS AFFICHEES

- Tack K., **Caboche J.**, Menut D., Delalain P., Denys S. Speciation dans les sols. Complémentarité des techniques d'analyses physiques : cas du plomb (Pb). Séminaire Spéciation, 22-23 Janvier **2008**, Montpellier, France.

- **Caboche J.**, Denys S., Tack K., Jondreville C., Rychen G., Feidt C. Evaluation of *in vivo* bioavailability and *in vitro* bioaccessibility of antimony in soils. Poster presentation in 19th annual meeting SETAC, 31 May-4 June **2009**, Göteborg, Sweden.

- **Caboche J.**, Denys S., Tack K., Jondreville C., Rychen G., Feidt C. Validation of the Unified Barge Method by bioavailability assessment in contaminated soils. Poster presentation in 19th annual meeting SETAC, 31 May-4 June **2009**, Göteborg, Sweden.

- **Caboche J.**, Denys S., Tack K., Jondreville C., Rychen G., Feidt C. Validation d'un test de mesure de la bioaccessibilité du plomb dans les sols pollués. Deuxièmes rencontres nationales de la Recherche sur les sites et sols pollués : pollutions locales et diffuses, Paris, les 20 et 21 octobre **2009**.

Table des matières

Remerciements.....3

Résumé.....5

Abstract.....5

Valorisation scientifique des travaux.....6

Table des Figures.....12

Table des Tableaux.....14

Table des Equations.....16

Liste des abréviations.....17

Introduction, contexte et objectifs de l'étude.....19

Chapitre I Biodisponibilité orale et bioaccessibilité des éléments traces métalliques dans les sols.....23

I.) Qu'est ce que la biodisponibilité orale ?.....23

I.1) Définition.....23

I.2) Le processus de biodisponibilité orale pour l'homme.....25

I.2.1) La solubilisation des contaminants.....25

I.2.2) L'absorption des contaminants.....29

I.2.2.1) L'intestin grêle.....29

I.2.2.2) L'absorption des éléments métalliques.....31

I.2.3) Fraction de composé atteignant la circulation systémique.....33

II.) Les facteurs influençant la bioaccessibilité et la biodisponibilité des ETM.....34

II.1) Facteurs influençant la bioaccessibilité.....34

II.1.1) Interactions des ETM avec les constituants de la matrice sol.....34

II.1.2) Influence de la spéciation et des propriétés physico-chimiques du sol.....38

II.2) Facteurs influençant l'absorption.....40

II.2.1) Influence de l'âge sur l'absorption des contaminants.....41

II.2.2) Influence de l'état nutritionnel sur les paramètres du tractus gastro-intestinal.....41

III.) Mesure de la biodisponibilité.....43

III.1) La biodisponibilité absolue.....43

III.1.1) Définition de la biodisponibilité absolue.....43

III.1.2) Mesure de la biodisponibilité absolue.....43

III.2) La biodisponibilité relative.....44

III.2.1) Définition de la biodisponibilité relative.....44

III.2.2) Mesure de la biodisponibilité relative.....47

III.3) Les espèces animales utilisées pour estimer la biodisponibilité pour l'homme.....49

III.4) Les principales études de biodisponibilité relative.....51

IV) Mesure de la fraction bioaccessible……...53
IV.1) La bioaccessibilité : une étape limitante de la biodisponibilité……53
IV.2) Les principaux tests *in vitro* de bioaccessibilité……54
IV.2.1) Les tests in vitro dynamiques……54
IV.2.2) Les tests statiques simplifiés ou basés sur la physiologie du tractus gastro-intestinal……...55
IV.3) Les problèmes liés à la mesure de la bioaccessibilité……58
IV.3.1) Manque d'uniformité dans les paramètres des tests in vitro……..58
IV.3.2) Variation des valeurs de bioaccessibilité en fonction du test in vitro utilisé……..58

V.) Conclusion……62

Chapitre 2 Présentation des sites étudiés et caractérisation physico-chimique des sols échantillonnés ……65

I.) Historique des sites d'étude et échantillonnage des sols……65
I.1) Situations géographiques et historiques de contamination……65
I.1.1) Historique du site écossais de Glendinning……..65
I.1.2) Historique des sites du sud de la France : mines de Villemagne et du Bleymard……...66
I.1.3) Historique du site du Nord-Pas-De-Calais : Communes avoisinantes de Noyelles-Godault……...66
I.2) Echantillonnage, conservation et prétraitement des sols……67

II.) Caractérisation physico-chimiques des sols et des associations entre les éléments d'intérêts et les phases porteuses……...68
II.1) Détermination des concentrations en éléments métalliques dans les sols……68
II.1.1) Les méthodes d'extraction……...68
II.1.2) Contrôle qualité de la minéralisation……...68
II.1.3) Les concentrations en éléments métalliques des sols……..70
II.2) Détermination des paramètres physico-chimiques des sols……70
II.3) Estimation de la distribution des ETM par le biais d'une procédure d'extraction séquentielle……72
II.3.1) Principe de la technique……..73
II.3.2) Protocole d'extraction……75
II.3.3) Contrôle qualité de la procédure d'extraction séquentielle……77
II.3.4) Distribution des ETM sur les phases porteuses……...77

III.) Conclusion……83

Chapitre 3 Développement d'une méthode *in vivo* pour déterminer la biodisponibilité relative du plomb, du cadmium, de l'arsenic et de l'antimoine dans les sols……85

I.) Matériels et méthodes……...85
I.1) Sélection des sols étudiés……85
I.2) Le modèle porcelet……87
I.3) Calcul de la biodisponibilité relative……87
I.4) Les formes de référence et les compartiments cibles utilisés……88

I.4.1) Les formes de référence……88
I.4.2) Les compartiments cibles……89
I.5) Les doses d'exposition……91
I.6) La procédure expérimentale……94
I.7) Prélèvement et traitement des compartiments cibles……96
I.8) Analyses des échantillons……98
I.9) Contrôle qualité de l'expérience *in vivo*……98
I.10) Analyses statistiques des données……99
II.) Résultats et discussion……102
II.1) Impact des doses d'exposition sur les porcelets……102
II.2) Les courbes dose-réponse des ETM au sein de chaque compartiment cible……102
II.2.1) Les courbes dose-réponse pour le plomb……103
II.2.2) Les courbes dose-réponse pour le cadmium……108
II.2.3) Les courbes dose-réponse pour l'arsenic……110
II.2.4) Les courbes dose-réponse pour l'antimoine……114
II.3) Biodisponibilité relative des ETM dans les sols……118
II.3.1) Détermination de la biodisponibilité relative du plomb dans les sols……118
II.3.2) Détermination de la biodisponibilité relative du cadmium dans les sols……120
II.3.3) Détermination de la biodisponibilité relative de l'arsenic dans les sols……122
II.3.4) Détermination de la biodisponibilité relative de l'antimoine dans les sols……124
II.4) Choix des compartiments cibles qui seront utilisés dans les études de corrélation……126
III.) Conclusion……129
Chapitre 4 Estimation de la bioaccessibilité des contaminants métalliques dans 15 sols contaminés par l'utilisation du test *in vitro* unifié BARGE…130
I.) Matériels et méthodes……131
I.1) Le test *in vitro* BARGE unifié (UBM)……131
I.1.1) Origine et développement du test in vitro UBM……131
I.1.2) Le protocole expérimental……133
I.2) Analyses des échantillons et détermination de la bioaccessibilité……137
I.3) Contrôle qualité de l'étude *in vitro*……138
I.4) Analyses statistiques……138
II.) Résultats……140
II.1) Bioaccessibilité absolue dans les matériaux de référence……140
II.2) Bioaccessibilité absolue pour les formes de référence……144
II.3) Bioaccessibilité des ETM dans les sols contaminés……147
II.3.1) Résultats de bioaccessibilité pour le plomb……147
II.3.1.1) Bioaccessibilité gastrique absolue du plomb……147
II.3.1.2) Bioaccessibilité intestinale absolue du plomb……147
II.3.1.3) Bioaccessibilité relative du plomb……149

II.3.2) Résultats de bioaccessibilité pour le cadmium……..151
II.3.2.1) Bioaccessibilité gastrique absolue du cadmium……151
II.3.2.2) Bioaccessibilité intestinale absolue du cadmium……151
II.3.1.3) Bioaccessibilité relative du cadmium……153
II.3.3) Résultats de bioaccessibilité pour l'arsenic……...155
II.3.4) Résultats de bioaccessibilité pour l'antimoine……..157

III.) Discussion……159
III.1) Variation de la bioaccessibilité des éléments métalliques dans les sols……159
III.2) Le rôle des caractéristiques physico-chimiques et de la distribution des ETM sur les phases porteuses……160
III.3) Comportement spécifique des contaminants au sein des différentes phases digestives du test UBM……173

Chapitre 5 Etude de la validation du modèle *in vitro* UBM……176

I.) La démarche utilisée pour corréler biodisponibilité *in vivo* et bioaccessibilité *in vitro*……176
I.1) Détermination des corrélations entre biodisponibilité relative et bioaccessibilité relative.176
I.2) Détermination de critères d'acceptabilité……177
I.2.1) Critères de qualité de la corrélation……178
I.2.2) Critères du modèle de corrélation……...178

II.) Résultats……...183
II.1) Etude des corrélations *in vivo/in vitro* pour le plomb……183
II.1.1) Résultats pour la phase gastrique du test UBM……183
II.1.2) Résultats pour la phase gastro-intestinale du test UBM……185
II.2) Etude des corrélations *in vivo/in vitro* pour le cadmium……185
II.2.1) Résultats pour la phase gastrique du test UBM……185
II.2.2) Résultats pour la phase gastro-intestinale du test UBM……187
II.3) Etude des corrélations *in vivo/in vitro* pour l'arsenic……187
II.3.1) Résultats pour la phase gastrique du test UBM……187
II.3.2) Résultats pour la phase gastro-intestinale du test UBM……189
II.4) Etude des corrélations pour l'antimoine……189

III.) Discussion……191
III.1) Comparaison des paramètres de validation des tests in vitro publiés……191
III.2) Une approche multicritère pour valider le test UBM……193
III.3) Bioaccessibilité gastrique ou intestinale ?……198

IV.) Conclusion……...199

Conclusion générale et perspectives…….....200

Références bibliographiques…….....205

Normes Citées…….....222

ANNEXES…….....223

Table des Figures

FIGURE 1 : MODELE CONCEPTUEL DU PROCESSUS DE BIODISPONIBILITE ORALE 26
FIGURE 2 : STRUCTURE DE L'INTESTIN GRELE : AMPLIFICATION DE LA SURFACE D'ECHANGE 28
FIGURE 3 : AGRANDISSEMENT D'UNE VILLOSITE MONTRANT UN VAISSEAU CHYLIFERE, DES CAPILLAIRES, UNE GLANDE INTESTINALE ET CERTAINS TYPES DE CELLULES DE LA MUQUEUSE *(VERSANTVOORT ET AL., 2000)* 28
FIGURE 4 : PRESENTATION DES DIFFERENTS MECANISMES D'ABSORPTION AU TRAVERS DE LA MEMBRANE DE L'EPITHELIUM INTESTINAL 30
FIGURE 5 : SCHEMATISATION DES DIFFERENTS PROCESSUS DE SORPTION SE PRESENTANT ENTRE UN ELEMENT TRACE METALLIQUE ET LA MATRICE SOL *(D'APRES MANCEAU ET AL., 2002)* 35
FIGURE 6 : POURCENTAGE DE PLOMB EXTRAIT DANS CHAQUE PHASE D'EXTRACTION SEQUENTIELLE DANS LES SOLS ISSUS DE DEUX HISTORIQUES DE CONTAMINATION DIFFERENTS 76
FIGURE 7 : POURCENTAGE DE CADMIUM EXTRAIT DANS CHAQUE PHASE D'EXTRACTION SEQUENTIELLE DANS LES SOLS ISSUS DE DEUX HISTORIQUES DE CONTAMINATION DIFFERENTS 78
FIGURE 8 : POURCENTAGE D'ARSENIC EXTRAIT DANS CHAQUE PHASE D'EXTRACTION SEQUENTIELLE DANS LES SOLS ISSUS DE DEUX HISTORIQUES DE CONTAMINATION DIFFERENTS 80
FIGURE 9 : POURCENTAGE D'ANTIMOINE EXTRAIT DANS CHAQUE PHASE D'EXTRACTION SEQUENTIELLE DANS LES SOLS ISSUS DE DEUX HISTORIQUES DE CONTAMINATION DIFFERENTS 82
FIGURE 10 : DISPOSITIF EXPERIMENTAL UTILISE DURANT LES 14 LOTS 95
FIGURE 11 : RESUME DES DIFFERENTES ETAPES DE PRELEVEMENT ET DE PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR L'ANALYSE 97
FIGURE 12 : EXEMPLE DE COURBES DOSE-REPONSE OBTENUES POUR DIFFERENTS SOLS ET POUR L'ACETATE DE PLOMB DANS L'OS (MOYENNE ± ECART-TYPE, N=3) 101
FIGURE 13 : COURBES DOSE-REPONSE OBTENUES POUR LES SOLS 15 ET 16 ET POUR L'ACETATE DE PLOMB DANS LE FOIE (MOYENNE ± ECART-TYPE, N=3) 105
FIGURE 14: EXEMPLE DE COURBES DOSE-REPONSE OBTENUES POUR DIFFERENTS SOLS ET POUR L'ACETATE DE PLOMB DANS LE FOIE (MOYENNE ± ECART-TYPE, N=3) 105
FIGURE 15 : EXEMPLE DE COURBES DOSE-REPONSE OBTENUES POUR DIFFERENTS SOLS ET POUR LE CHLORURE DE CADMIUM DANS LES REINS (MOYENNE ± ECART-TYPE, N=3) 107
FIGURE 16 : EXEMPLE DE COURBES DOSE-REPONSE OBTENUES POUR DIFFERENTS SOLS ET POUR L'ARSENIATE DE SODIUM DANS L'URINE (MOYENNE ± ECART-TYPE, N=3) 111
FIGURE 17 : EXEMPLE DE COURBES DOSE-REPONSE OBTENUES POUR TROIS SOLS ET POUR L'ANTIMONIATE DE POTASSIUM DANS L'URINE (MOYENNE ± ECART-TYPE, N=3) 115
FIGURE 18 : EXEMPLE DE COURBES DOSE-REPONSE OBTENUES DANS L'URINE POUR LES DEUX SOLS LES PLUS FORTEMENT CONTAMINES EN ANTIMOINE (MOYENNE ± ECART-TYPE, N=3) 115
FIGURE 19 : SCHEMA RECAPITULATIF DU TEST *IN VITRO* UNIFIE BARGE (UBM) 134
FIGURE 20: BIOACCESSIBILITE ABSOLUE DES ELEMENTS TRACES METALLIQUES DANS LE SOL DE REFERENCE SMR 2710 (N=50) 139
FIGURE 21 : BIOACCESSIBILITE ABSOLUE DES ELEMENTS TRACES METALLIQUES DANS LE SOL DE REFERENCE SMR 2711 (N=50) 139
FIGURE 22 : BIOACCESSIBILITE ABSOLUE DU PLOMB DANS LES SOLS MINIERS, MOYENNE ± ECART-TYPE (N=5). UNE LETTRE COMMUNE (MAJUSCULE POUR LA PHASE GASTRIQUE ET MINUSCULE POUR LA PHASE INTESTINALE) MONTRE L'ABSENCE DE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE ENTRE LES SOLS (TEST DE TUKEY-KRAMER, A = 5%) 146
FIGURE 23 : BIOACCESSIBILITE ABSOLUE DU PLOMB DANS LES SOLS DE FONDERIE, MOYENNE ± ECART-TYPE (N=5). UNE LETTRE COMMUNE (MAJUSCULE POUR LA PHASE GASTRIQUE ET MINUSCULE POUR LA PHASE INTESTINALE) MONTRE L'ABSENCE DE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE ENTRE LES SOLS (TEST DE TUKEY-KRAMER, A = 5%) 146
FIGURE 24 : BIOACCESSIBILITE RELATIVE DU PLOMB DANS LES SOLS MINIERS, MOYENNE ± ECART-TYPE (N=5). UNE LETTRE COMMUNE (MAJUSCULE POUR LA PHASE GASTRIQUE ET MINUSCULE POUR LA PHASE INTESTINALE) MONTRE L'ABSENCE DE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE ENTRE LES SOLS (TEST DE TUKEY-KRAMER, A = 5%) 148
FIGURE 25 : BIOACCESSIBILITE RELATIVE DU PLOMB DANS LES SOLS DE FONDERIE, MOYENNE ± ECART-TYPE (N=5). UNE LETTRE COMMUNE (MAJUSCULE POUR LA PHASE GASTRIQUE ET MINUSCULE POUR LA PHASE INTESTINALE) MONTRE L'ABSENCE DE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE ENTRE LES SOLS (TEST DE TUKEY-KRAMER, A = 5%) 148

FIGURE 26 : BIOACCESSIBILITE ABSOLUE DU CADMIUM DANS LES SOLS MINIERS, MOYENNE ± ECART-TYPE (N=5). UNE LETTRE COMMUNE (MAJUSCULE POUR LA PHASE GASTRIQUE ET MINUSCULE POUR LA PHASE INTESTINALE) MONTRE L'ABSENCE DE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE ENTRE LES SOLS (TEST DE TUKEY-KRAMER, A = 5%) 150
FIGURE 27 : BIOACCESSIBILITE ABSOLUE DU CADMIUM DANS LES SOLS DE FONDERIE, MOYENNE ± ECART-TYPE (N=5). UNE LETTRE COMMUNE (MAJUSCULE POUR LA PHASE GASTRIQUE ET MINUSCULE POUR LA PHASE INTESTINALE) MONTRE L'ABSENCE DE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE ENTRE LES SOLS (TEST DE TUKEY-KRAMER, A = 5%) 150
FIGURE 28 : BIOACCESSIBILITE RELATIVE DU CADMIUM DANS LES SOLS MINIERS, MOYENNE ± ECART-TYPE (N=5). UNE LETTRE COMMUNE (MAJUSCULE POUR LA PHASE GASTRIQUE ET MINUSCULE POUR LA PHASE INTESTINALE) MONTRE L'ABSENCE DE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE ENTRE LES SOLS (TEST DE TUKEY-KRAMER, A = 5%) 152
FIGURE 29 : BIOACCESSIBILITE RELATIVE DU CADMIUM DANS LES SOLS DE FONDERIE, MOYENNE ± ECART-TYPE (N=5). UNE LETTRE COMMUNE (MAJUSCULE POUR LA PHASE GASTRIQUE ET MINUSCULE POUR LA PHASE INTESTINALE) MONTRE L'ABSENCE DE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE ENTRE LES SOLS (TEST DE TUKEY-KRAMER, A = 5%) 152
FIGURE 30 : BIOACCESSIBILITE RELATIVE DE L'ARSENIC DANS LES SOLS MINIERS, MOYENNE ± ECART-TYPE (N=5). UNE LETTRE COMMUNE (MAJUSCULE POUR LA PHASE GASTRIQUE ET MINUSCULE POUR LA PHASE INTESTINALE) MONTRE L'ABSENCE DE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE ENTRE LES SOLS (TEST DE TUKEY-KRAMER, A = 5%) 154
FIGURE 31 : BIOACCESSIBILITE RELATIVE DE L'ARSENIC DANS LES SOLS DE FONDERIE, MOYENNE ± ECART-TYPE (N=5). UNE LETTRE COMMUNE (MAJUSCULE POUR LA PHASE GASTRIQUE ET MINUSCULE POUR LA PHASE INTESTINALE) MONTRE L'ABSENCE DE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE ENTRE LES SOLS (TEST DE TUKEY-KRAMER, A = 5%) 154
FIGURE 32 : BIOACCESSIBILITE RELATIVE DE L'ANTIMOINE DANS LES SOLS MINIERS, MOYENNE ± ECART-TYPE (N=5). UNE LETTRE COMMUNE (MAJUSCULE POUR LA PHASE GASTRIQUE ET MINUSCULE POUR LA PHASE INTESTINALE) MONTRE L'ABSENCE DE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE ENTRE LES SOLS (TEST DE TUKEY-KRAMER, A = 5%) 156
FIGURE 33 : BIOACCESSIBILITE RELATIVE DE L'ANTIMOINE DANS LES SOLS DE FONDERIE, MOYENNE ± ECART-TYPE (N=5). UNE LETTRE COMMUNE (MAJUSCULE POUR LA PHASE GASTRIQUE ET MINUSCULE POUR LA PHASE INTESTINALE) MONTRE L'ABSENCE DE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE ENTRE LES SOLS (TEST DE TUKEY-KRAMER, A = 5%) 156
FIGURE 34 : RESULTATS DE L'ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE ENTRE LE PLOMB BIOACCESSIBLE (%) ET LES EXTRACTIONS SEQUENTIELLES 163
FIGURE 35 : RESULTATS DE L'ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE ENTRE CADMIUM BIOACCESSIBLE (%) ET LES EXTRACTIONS SEQUENTIELLES 165
FIGURE 36 : RESULTATS DE L'ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE ENTRE L'ARSENIC BIOACCESSIBLE (%) ET LES EXTRACTIONS SEQUENTIELLES 169
FIGURE 37 : CORRELATION ENTRE LA BIOACCESSIBILITE INTESTINALE RELATIVE (BIOACC REL (%)) DETERMINEE PAR LE TEST *IN VITRO* UBM ET LA BIODISPONIBILITE RELATIVE (BR (%)) DETERMINEE A PARTIR DES DONNEES OBTENUES DANS LE REIN (N=14). 182
FIGURE 38 : CORRELATION ENTRE LA BIOACCESSIBILITE GASTRIQUE RELATIVE (BIOACC REL (%)) DETERMINEE PAR LE TEST *IN VITRO* UBM ET LA BIODISPONIBILITE RELATIVE (BR (%)) DETERMINEE A PARTIR DES DONNEES OBTENUES DANS LE REIN (N=14). ... 182
FIGURE 39 : CORRELATION ENTRE LA BIOACCESSIBILITE GASTRIQUE RELATIVE (BIOACC REL (%)) DETERMINEE PAR LE TEST *IN VITRO* UBM ET LA BIODISPONIBILITE RELATIVE (BR (%)) DETERMINEE A PARTIR DES DONNEES DU REIN (N=10). 184
FIGURE 40 : CORRELATION ENTRE LA BIOACCESSIBILITE GASTRO-INTESTINALE RELATIVE (BIOACC REL (%)) DETERMINEE PAR LE TEST *IN VITRO* UBM ET LA BIODISPONIBILITE RELATIVE (BR (%)) DETERMINEE A PARTIR DES DONNEES DU REIN (N=10). 184
FIGURE 41 : CORRELATION ENTRE LA BIOACCESSIBILITE GASTRO-INTESTINALE RELATIVE (BIOACC REL (%)) DETERMINEE PAR LE TEST *IN VITRO* UBM ET LA BIODISPONIBILITE RELATIVE (BR (%)) DETERMINEE A PARTIR DES DONNEES OBTENUES DANS L'URINE (N=13). 186
FIGURE 42 : CORRELATION ENTRE LA BIOACCESSIBILITE GASTRIQUE RELATIVE (BIOACC REL (%)) DETERMINEE PAR LE TEST *IN VITRO* UBM ET LA BIODISPONIBILITE RELATIVE (BR (%)) DETERMINEE A PARTIR DES DONNEES OBTENUES DANS L'URINE (N=13). ... 186
FIGURE 43 : CORRELATION ENTRE LA BIOACCESSIBILITE GASTRIQUE RELATIVE (BIOACC REL (%)) DETERMINEE PAR LE TEST *IN VITRO* UBM ET LA BIODISPONIBILITE RELATIVE (BR (%)) DETERMINEE A PARTIR DES DONNEES OBTENUES DANS L'URINE (N=11). ... 188
FIGURE 44 : CORRELATION ENTRE LA BIOACCESSIBILITE GASTRO-INTESTINALE RELATIVE (BIOCC REL (%)) DETERMINEE PAR LE TEST *IN VITRO* UBM ET LA BIODISPONIBILITE RELATIVE (BR (%)) DETERMINEE A PARTIR DES DONNEES OBTENUES DANS L'URINE (N=11). 188

Table des Tableaux

TABLEAU 1 : CARACTERISTIQUES DES COMPARTIMENTS IMPLIQUES DANS LE PROCESSUS DE DIGESTION CHEZ L'HOMME 24
TABLEAU 2 : IMPACT DE L'HISTORIQUE DE CONTAMINATION ET DE CERTAINS PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DU SOL SUR LA BIODISPONIBILITE DES ELEMENTS METALLIQUES DANS LES SOLS 37
TABLEAU 3 : PRINCIPALES ETUDES IN VIVO PUBLIEES DETERMINANT LA BIODISPONIBILITE RELATIVE DES ELEMENTS TRACES METALLIQUES DANS LES SOLS 46
TABLEAU 4 : RESUME DES PRINCIPAUX TESTS *IN VITRO* DE DIGESTION PERMETTANT D'ESTIMER LA BIOACCESSIBILITE DES CONTAMINANTS DU SOL 54
TABLEAU 5 : PRINCIPALES ETUDES *IN VITRO* ESTIMANT LA BIOACCESSIBILITE DES ETM DANS LES SOLS 56
TABLEAU 6 : VALEURS DE BIOACCESSIBILITE (%) (± L'ECART TYPE N = 3, SAUF INDICATION) DE L'ARSENIC, DU PLOMB ET DU CADMIUM APRES DIGESTION *IN VITRO* A L'AIDE DE SIX TESTS DIFFERENTS ET DANS TROIS TYPES DE SOL (OOMEN *ET AL.*, 2002). 60
TABLEAU 7 : POURCENTAGE DE RECOUVREMENT DES ETM DANS LES MATERIAUX DE REFERENCE (SMR 2710 ET 2711) APRES MINERALISATION A L'EAU REGALE ET ANALYSE A L'ICP-OES 69
TABLEAU 8 : CONCENTRATIONS EN ELEMENTS TRACES METALLIQUES DETERMINEES PAR MINERALISATION A L'EAU REGALE POUR L'ENSEMBLE DES SOLS ECHANTILLONNES SUR CHAQUE SITE CONTAMINE 69
TABLEAU 9 : PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES POUR L'ENSEMBLE DES SOLS ECHANTILLONNE SUR CHAQUE SITE CONTAMINE 71
TABLEAU 10 : CONDITIONS EXPERIMENTALES DU PROTOCOLE D'EXTRACTION SEQUENTIELLE 74
TABLEAU 11 : CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES 15 SOLS SELECTIONNES POUR L'ETUDE DE LA BIODISPONIBILITE RELATIVE 86
TABLEAU 12: QUANTITES DE CONTAMINANTS (µG) INGERES PAR JOUR POUR LES 15 SOLS CONTAMINES SUITE A L'INGESTION DE 0,5G ; 1G ET 2G DE SOL 90
TABLEAU 13: DOSES D'EXPOSITION UTILISEES POUR CHAQUE FORME DE REFERENCE 93
TABLEAU 14 : ESTIMATION DES PENTES DES COURBES DOSE-REPONSE OBTENUES POUR LE PLOMB AU SEIN DE CHACUN DES COMPARTIMENTS CIBLES 104
TABLEAU 15 : ESTIMATION DES PENTES DES COURBES DOSE-REPONSE OBTENUES POUR LE CADMIUM AU SEIN DE CHACUN DES COMPARTIMENTS CIBLES 109
TABLEAU 16 : ESTIMATION DES PENTES DES COURBES DOSE-REPONSE OBTENUES POUR L'ARSENIC AU SEIN DE CHACUN DES COMPARTIMENTS CIBLES 113
TABLEAU 17 : ESTIMATION DES PENTES DES COURBES DOSE-REPONSE OBTENUES POUR L'ANTIMOINE AU SEIN DE CHACUN DES COMPARTIMENTS CIBLES 117
TABLEAU 18 : ESTIMATION DE LA BIODISPONIBILITE RELATIVE DU PLOMB DANS LES 16 SOLS CONTAMINES ET AU SEIN DES QUATRE COMPARTIMENTS CIBLES 119
TABLEAU 19 : ESTIMATION DE LA BIODISPONIBILITE RELATIVE DU CADMIUM DANS LES 16 SOLS CONTAMINES ET AU SEIN DES QUATRE COMPARTIMENTS CIBLES 121
TABLEAU 20 : ESTIMATION DE LA BIODISPONIBILITE RELATIVE DE L'ARSENIC DANS LES 16 SOLS CONTAMINES ET AU SEIN DES QUATRE COMPARTIMENTS CIBLES 123
TABLEAU 21 : ESTIMATION DE LA BIODISPONIBILITE RELATIVE DE L'ANTIMOINE DANS LES 16 SOLS CONTAMINES ET AU SEIN DES QUATRE COMPARTIMENTS CIBLES 125
TABLEAU 22 : RESUME DES CARACTERISTIQUES DES MODELES OBTENUS POUR LE PLOMB AU SEIN DE CHAQUE COMPARTIMENT CIBLE ET NOMBRE DE SOLS POUR LEQUEL LA BIODISPONIBILITE RELATIVE DU PLOMB A PU ETRE CALCULEE. 128
TABLEAU 23 : RESUME DES CARACTERISTIQUES DES MODELES OBTENUS POUR L'ARSENIC AU SEIN DE CHAQUE COMPARTIMENT CIBLE ET LE NOMBRE DE SOLS POUR LEQUEL LA BIODISPONIBILITE RELATIVE DE L'ARSENIC A PU ETRE CALCULEE. 128
TABLEAU 24 : RESUME DES CARACTERISTIQUES DES MODELES OBTENUS POUR LE CADMIUM AU SEIN DE CHAQUE COMPARTIMENT CIBLE ET LE NOMBRE DE SOL POUR LEQUEL LA BIODISPONIBILITE RELATIVE DU CADMIUM A PU ETRE CALCULEE. 128
TABLEAU 25: RESUME DES CARACTERISTIQUES DES MODELES OBTENUS POUR L'ANTIMOINE AU SEIN DE CHAQUE COMPARTIMENT CIBLE ET LE NOMBRE DE SOLS POUR LEQUEL LA BIODISPONIBILITE RELATIVE DE L'ANTIMOINE A PU ETRE CALCULEE. 128
TABLEAU 26 : COMPOSITION DES SOLUTIONS DIGESTIVES POUR LE TEST *IN VITRO* UBM 132
TABLEAU 27 : VALEURS MINIMALES, MAXIMALES ET MOYENNES DE BIOACCESSIBILITE DES ETM DANS LES MATERIAUX DE REFERENCE (SMR 2710 ET SMR 2711) DETERMINEES A PARTIR DES DIFFERENTES ETUDES PUBLIEES 141
TABLEAU 28 : RESUME DES RESULTATS DES CARTES DE CONTROLE ETABLIES SELON LA NORME XPT 90-220 POUR LES MATERIAUX DE REFERENCE SMR 2710 ET SMR 2711 143
TABLEAU 29 : BIOACCESSIBILITE ABSOLUE (%) DE CHAQUE FORME DE REFERENCE UTILISEE POUR LA DETERMINATION DE LA BIODISPONIBILITE RELATIVE (MOYENNE ± ECART-TYPE, N=5) 145

TABLEAU 30 : MEDIANES DES COEFFICIENTS DE VARIATION DE LA BIOACCESSIBILITE OBTENUS POUR LES 4 CONTAMINANTS AU SEIN DES 15 SOLS CONTAMINES DANS CHACUNE DES PHASES DIGESTIVES DU TEST UBM 157
TABLEAU 31 : VALEURS DES COEFFICIENTS DE VARIATION OBTENUS POUR DES DEUX MATERIAUX DE REFERENCE (N=50) 158
TABLEAU 32 : MATRICE DE CORRELATION PEARSON ENTRE LA BIOACCESSIBILLITE DU PLOMB, LES PARAMETRES DU SOL ET LES EXTRACTIONS SEQUENTIELLES 163
TABLEAU 33 : MATRICE DE CORRELATION PEARSON ENTRE BIOACCESSIBILLITE DU CADMIUM, LES PARAMETRES DU SOL ET LES EXTRACTIONS SEQUENTIELLES 165
TABLEAU 34 : PRINCIPAUX MODELES DE PREDICTION DE LA BIOACCESSIBILITE DE L'ARSENIC OBTENUS A PARTIR DES PARAMETRES DU SOL 167
TABLEAU 35 : RESULTATS MATRICE DE CORRELATION PEARSON ENTRE LA BIOACCESSIBILLITE DE L'ARSENIC, LES PARAMETRES DU SOL ET LES EXTRACTIONS SEQUENTIELLES 167
TABLEAU 36 : RESULTATS DE LA MATRICE DE CORRELATION PEARSON ENTRE BIOACCESSIBILLITE DE L'ANTIMOINE, PARAMETRES DU SOL ET EXTRACTIONS SEQUENTIELLES 172
TABLEAU 37 : COMPARAISONS DES CRITERES D'ACCEPTABILITE ETABLIS AU SEIN DE L'ETUDE PAR RAPPORT AUX VALEURS OBTENUES PAR LES PRINCIPALES ETUDES DE CORRELATION *IN VIVO/IN VITRO* 190

Table des Equations

Équation 1 : Determination de la biodisponibilite absolue 43
Équation 2 : Determination de la biodisponibilite relative 44
Équation 3 : Determination de la biodisponibilite relative 88
Équation 4 : Determination de la bioaccessibilite absolue 136
Équation 5 : Determination de la bioaccessibilite relative 136
Équation 6 : Equation detaillee de la pente de correlation entre bioaccessibilite relative et biodisponibilite relative 179
Équation 7 : Equation simplifiee de la pente de correlation entre bioaccessibilite relative et biodisponibilite relative 180

Liste des abréviations

ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
BA	Biodisponibilité Absolue
BARGE	BioAvailability Research Group Europ
BGS	British Geological Survey
Bioacc Rel	Bioaccessibilité Relative
BR	Biodisponibilité Relative
BRGM	Bureau de Recherches Geologiques et Minières
CEC	Capacité d'Echange Cationique
CIVIV	Corrélation In vivo In vitro
CISED	Chemometric Identification of Substrates and Element Distribution
CV	Coefficient de Variation
DIN	Deutsches Institut fur Normung
DRX	Diffraction des Rayons X
EQRS	Evaluation Quantitative des Risques Sanitaires
ET	Ecart-Type
ETM	Elément Trace Métallique
ETR	Ecart-Type Résiduel
EXAFS	Extended X-Ray Absorption Fine Structure (Spectrométrie d'absorption des rayons X)
FRMEL	Functional Relationship Estimation by Maximun Likehood
HAP	Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
IC	Intervalle de Confiance
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (Spectrométrie d'émission optique couplée à un plasma induit)
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (Spectrométrie de masse couplée à un plasma induit)
INERIS	Institut de l'Environnement Industriels et des Risques
ISA	Institut Supérieur d'Agriculture
ISAE	International Society of Exposure Analysis
IVG	In Vitro Gastrointestinal
LIBS	Laser Induced Breakdown Spectroscopy (Spectroscopie de plasma induit par laser)
Max	Maximale
MED-EDS	Miscroscopie Electronique à Balayage couplée à X-ray Energy Dispersive Spectrometry
Min	Minimale
MO	Matière organique
MS	Matière Sèche
ND	Non Déterminée
NIST	National Institute of Standards and Technology
NRC	National Research Council
PBET	Physiologically Based Extraction Test
PCB	Polychlorobiphényles
PV	Poids Vif

Ref	Référence
RIVM	Rijksinstituut voor Volksgezondheld en Milieu
SA	Société Anonyme
SBRC	Solubility Bioavailability Research Consortium
SHIME	Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem
SMR	Standard Material Reference
TIM	TNO In vitro Method
UBM	Unified Barge Method
USEPA	United States Environmental Protection Agency

INTRODUCTION, CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

Un site pollué peut se définir comme un site qui, du fait d'anciens dépôts de déchets ou d'infiltration de substances polluantes, présente une pollution susceptible de provoquer une nuissance ou un risque pérenne pour l'environnement ou la sécurité des personnes (http://www.sites-pollues.ecologie.gouv.fr/). La nature des principaux polluants rencontrés sur les sites pollués est très diversifiée mais se répartit en deux grandes familles : les éléments inorganiques et organiques. Les polluants inorganiques incluent notamment la famille des éléments traces métalliques (ETM) qui regroupe à la fois les métaux (plomb et cadmium, par exemple) et les métalloïdes (arsenic et antimoine, par exemple) (Baize, 1997). Ces éléments sont présents dans les sols par leur usage courant dans plusieurs processus industriels (extraction et l'exploitation de minerais, peinture, batterie…) ou encore par leur utilisation en agriculture. Les ETM ont tendance à s'accumuler progressivement dans les sols et plus précisément dans les horizons de surfaces riches en matière organique (en particulier pour les cations divalents) (Bourrelier et Berthelin, 1998 ; Baize *et al.*, 2002). Or, contrairement à de nombreux polluants organiques, les éléments métalliques ne peuvent être dégradés par décomposition (Baize, 1997). Ils présentent ainsi un caractère persistant qui peut engendrer, à terme, un risque pour l'environnement et la santé humaine. Concernant ce dernier point, la réhabilitation des sols pollués en zones fréquentés par des humains est particulièrement sensible. Ainsi, il est crucial pour nos sociétés d'étudier les différents impacts et risques des sols pollués afin de préserver la santé humaine des populations qui sont susceptibles d'y être exposées.

Les questions de pollution des sols par les activités industrielles font l'objet d'une prise de conscience que depuis peu de temps, une vingtaine d'années tout au plus, au regard de plus de deux siècles d'activité industrielle. En France, il n'existe pas de texte de loi concernant la prévention et la gestion des sols, mais on se référe à des réglementations spécifiques plus générales qui s'appliquent notamment dans le cadre de la législation des installations classées (Loi n°76-663 du 19 Juillet 1976), ou dans une moindre mesure à la législation sur les déchets (Loi n°2003-699 du 30 juillet 2003). La démarche d'évaluation quantitative des risques sanitaires (EQRS), telle que pratiquée actuellement en France pour les sites et sols pollués, consiste à effectuer une estimation de la survenue d'effets néfastes pour la santé en tenant

compte d'un ensemble d'éléments concernant les substances rencontrées et leur toxicité d'une part, et de l'exposition des populations à ces substances d'autre part.

L'exposition de l'Homme aux contaminants présents dans les sols peut survenir par différentes voies telles que l'inhalation de poussières, l'absorption cutanée et l'ingestion (Lanphear *et al.*, 1997 ; Paustenbach, 2000). L'évaluation quantitative des risques sanitaires montre que, pour des ETM non volatils, la voie d'exposition majeure est l'ingestion de terre et de poussières (Paustenbach, 2000 ; Kwon *et al.*, 2004 ; Carrizales *et al.*, 2005 ; Yamamoto *et al.*, 2006). Pour des raisons comportementales et physiologiques, la population sensible à l'ingestion de terre est constituée par les enfants de 0 à 6 ans (Lanphear *et al.*, 1996 ; Schütz *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 2003). En effet, l'ingestion de terre résulte principalement du comportement de portage des mains ou d'objets à la bouche qui est très fréquent chez les enfants âgés de 12 mois à 2 ans (Ellis et Schnoes, 2005 *;* Ljung, 2006). Il est usuellement considéré que les enfants ingèrent quotidiennement 100 à 150 $mg.j^{-1}$ de terre, indépendamment de comportements de type géophagie ou syndrome pica[1] (Stanek *et al.*, 1997 ; USEPA, 1997 ; Calabresse *et al.*, 1999). De plus, d'un point de vue toxicologique, les enfants sont plus sensibles à certains contaminants du sol comme les éléments métalliques. En effet, les enfants ont un système nerveux qui est plus sensible aux contaminants, comme le plomb par exemple, comparé aux adultes (paroi hémato-encéphalique plus perméable) (WHO, 1995 ; ATSDR, 2007b). Les enfants présentent également une plus forte absorption gastro-intestinale que les adultes (paroi gastro-intestinale plus perméable). Pour le plomb l'absorption gastro-intestinale est comprise entre 10 et 20% chez les adultes, et de 30 à 50% pour les enfants (Laquatra, 2001).

Pour évaluer l'exposition aux ETM suite à l'ingestion de terre, il est actuellement considéré que la concentration totale d'une substance présente dans un sol est à même d'être absorbée et de produire un effet toxique sur l'organisme humain (Peijnenburg *et al.*, 1997 ; Oomen *et al.*, 2006). Cependant, dans le cadre de l'exposition via l'ingestion de sol contaminé, plusieurs études démontrent que les contaminants présents dans le sol sont généralement moins absorbés et les effets toxiques sont plus faibles comparés à la même concentration de contaminants administrés à partir de sels solubles dans l'eau (Freeman *et al.*, 1992 ; Dieter *et al.*, 1993 ; Casteel *et al.*, 1997; Pu *et al.*, 2003 ; USEPA, 2004 ; Casteel *et al.*, 2006). Actuellement, la procédure d'évaluation des risques ne considère ni les caractéristiques du

[1] Le syndrome **pica** est un trouble du comportement alimentaire caractérisé par l'ingestion durable (plus d'un mois) de substances non nutritives (terre, craie, sable, papier, etc.). La **géophagie** désigne le fait de manger de la terre

métal en interaction avec le sol ni les limites d'absorption de l'élément (Kelley *et al.*, 2002 ; Oomen *et al.*, 2006). Cependant, les contaminants présents dans les sols ne sont pas exclusivement présents sous une forme solubilisable. En effet, le contaminant présent dans la matrice sol peut se trouver sous une forme non dissociable et ainsi être excrété par l'organisme sans être absorbé. L'absorption des contaminants du sol par le tractus gastro-intestinal peut être significativement influencée par les propriétés spécifiques de la matrice sol (minéralogie, taille des particules ingérées, propriétés physico-chimiques) (Ruby *et al.*, 1999 ; Peijnenburg et Jager, 2003). Le constat actuel est que sur la seule base de la concentration totale des contaminants dans le sol l'exposition peut être surestimée pour la voie ingestion de terre (Allen, 2002 ; Oomen *et al.*, 2006).

Ces dernières années, de nombreuses entités environnementales, nationales et internationales, ont démontré l'importance de la prise en compte de la notion de biodisponibilité pour développer une procédure d'évaluation des risques plus pertinente (Nathanail et McCaffey, 2003 ; Environment Agency (UK), 2005 ; Oomen *et al.*, 2006). La biodisponibilité correspond à la fraction de contaminant absorbée par la circulation systémique (Ruby *et al.*, 1999 ; Kelley *et al.*, 2002). Ainsi, la compréhension et la mesure adéquate de la biodisponibilité pourraient permettre d'affiner l'exposition aux éléments métalliques présents dans le sol (Palumbo et Klinck, 2002 ; Menzie *et al.*, 2003 ; Oomen *et al.*, 2006). L'ajustement de la dose d'exposition par la biodisponibilité, dans le but d'obtenir une évaluation plus réaliste, a donc depuis une dizaine d'années gagné une attention internationale (Ethlers et Luty, 2003 ; Roberts, 2004 ; Oomen *et al.*, 2006). La détermination de la biodisponibilité est généralement entreprise à l'aide de tests *in vivo* utilisant des animaux comme modèles de l'homme (Casteel *et al.*, 1997 ; USEPA, 2004 ; Roberts *et al.*, 2006 ; Juhasz *et al.*, 2007). Cependant, ces études sont longues, coûteuses et engendrent des problèmes éthiques. De ce fait, il est impossible de mettre en œuvre des mesures de biodisponibilité de manière générique pour chaque site pollué (Casteel *et al.*, 1997 ; Wragg et Cave, 2002).

Pour ces raisons, depuis une décennie, il y a un engouement pour le développement de tests *in vitro* simulant les conditions physico-chimiques du système digestif humain pour approcher la biodisponibilité de façon simplifiée (Ruby *et al.*, 1996 ; Oomen *et al.*, 2002 ; Wragg et Cave, 2002 ; Oomen *et al.*, 2003a ; Schroder *et al.*, 2004). Ces tests permettent d'estimer la bioaccessibilité, c'est à dire la fraction de contaminant qui est dissoute dans les fluides digestifs du tractus gastro-intestinal. Ils sont basés sur l'hypothèse que la bioaccessibilité est une étape limitante dans le processus de biodisponibilité. De nombreux tests sont actuellement

disponibles dans la littérature (Ruby *et al.*, 1996 ; Hamel *et al.*, 1998 ; Oomen *et al.*, 2002, 2003a ; Dominy *et al.*, 2004). Cependant, les résultats obtenus par les différents tests *in vitro* ne sont généralement pas comparables entre eux étant donné que les valeurs des paramètres simulés au sein de ces tests sont différentes (Oomen *et al.*, 2002 ; Seikat *et al.*, 2007). Par conséquent, au vu des nombreux protocoles publiés, le groupe BARGE[2], fédération d'instituts et de laboratoires pluridisciplinaires, a proposé un protocole unique et harmonisé de mesure de la bioaccessibilité. L'application en routine au sein de l'évaluation des risques d'un tel protocole nécessite toutefois la démonstration de la cohérence entre la mesure de la bioaccessibilité, notion purement chimique et la mesure de la biodisponibilité, notion physiologique.

L'objectif du travail présenté ici est de procéder à une telle démonstration. En particulier, il sera nécessaire, d'une part, de confirmer que l'étape de solubilisation est une étape limitante vis-à-vis de l'absorption et d'autre part que les mesures de bioaccessibilité sont corrélées aux mesures de biodisponibilité. Dans le cadre de l'étude, quatre éléments traces métalliques ont été choisis : antimoine, arsenic, cadmium et plomb. Le choix de ces quatre éléments sera détaillé à la fin du chapitre bibliographique.

Le plan de ce mémoire est le suivant. Dans une première partie, une synthèse bibliographique dresse un bilan des connaissances actuelles sur les notions de biodisponibilité et de bioaccessibilité, ce qui a permis de définir les objectifs de notre travail et de proposer les approches méthodologiques appropriées. Ensuite, la deuxième partie de ce travail présente les sites d'étude et la caractérisation physico-chimique (paramètres du sol et spéciation des phases porteuses) des 27 sols échantillonnés. Suite à cette caractérisation physico-chimique, 15 sols ont été sélectionnés afin de valider la méthode de mesure de la bioaccessibilité UBM développée par le groupe BARGE par des données de biodisponibilité. Les résultats de biodisponibilité obtenus pour les l5 sols contaminés par le biais du modèle porcelet font l'objet d'une troisième partie alors que le quatrième volet du mémoire présente le test de bioaccessibilité UBM mis en œuvre et les résultats obtenus pour les 15 sols. Finalement, le lien entre bioaccessibilité et biodisponibilité est étudié pour les quatre éléments choisis dans une cinquième partie. Les résultats sont discutés au sein de ce chapitre pour vérifier que les variations de bioaccessibilité déterminée par le test UBM reflètent correctement la variation de biodisponibilité des ETM suite à l'ingestion de terre.

[2] BARGE : Bioavailability Research Group Europe

Chapitre I

BIODISPONIBILITE ORALE ET BIOACCESSIBILITE DES ELEMENTS TRACES METALLIQUES DANS LES SOLS

Ce premier chapitre détaillera, dans un premier temps, le concept de biodisponibilité orale suite à l'ingestion de sol afin de mettre en évidence l'importance du phénomène de bioaccessibilité au sein de ce processus. Ensuite, les différents facteurs qui sont susceptibles d'influencer la biodisponibilité et la bioaccessibilité des ETM dans les sols seront présentés. Puis, les méthodes de mesure de ces deux paramètres seront décrites. Finalement, ce chapitre s'attardera sur les problèmes liés à la multiplication des protocoles *in vitro* et de ce fait abordera l'importance de la validation de ces tests en vue d'une possible utilisation en évaluation des risques.

I.) Qu'est ce que la biodisponibilité orale ?

I.1) Définition

Bien que très employé, le concept de biodisponibilité est encore mal défini (Peijnenburg *et al.* 1997). En effet, il n'y a pas de consensus clair sur la définition du terme de biodisponibilité (NRC, 2003 ; Semple *et al.,* 2004). Plusieurs définitions, dépendantes du champ scientifique dans lequel le terme est utilisé (biodégradation, absorption par les plantes, toxicologie humaine, écotoxicologie), existent dans la littérature. Ainsi, pour définir la biodisponibilité, il est important de préciser le domaine dans lequel ce terme est utilisé. Dans un cadre général, le concept de biodisponibilité orale peut se définir comme étant un mélange complexe de processus chimiques, biologiques et physiques qui agissent de telle façon que seulement une fraction du composé présent dans une matrice environnementale pourra être disponible pour un organisme (Batelle Exponent, 2000 ; Semple *et al.*, 2004). Dans cette étude, nous considérerons uniquement la biodisponibilité orale des polluants présents dans les sols. Ainsi, dans le cadre de l'évaluation des risques liée à l'ingestion de sol, la définition qui est généralement retenue mentionne que la biodisponibilité est la fraction de contaminant (ingéré dans le cadre de l'étude) qui est absorbée et qui atteint la circulation systémique (Ruby *et al.*, 1999 ; Kelley *et al.*, 2002).

Tableau 1 : Caractéristiques des compartiments impliqués dans le processus de digestion chez l'Homme

Compartiments		Surface	Longueur (m)	Temps de résidence	pH	Activités cataboliques	Effets sur la dissolution des contaminants
Bouche		100 cm^2		Quelques secondes à quelques minutes	6,5	Polysaccharides	L'écrasement améliore par la suite la dissolution
Œsophage		200 cm^2	0,25	Quelques secondes			
Estomac à jeun		3,5 m^2	0,025	8 à 15 minutes	1-2	Protéases, lipides	Les acides dissolvent les oxydes labiles, les sulfates et carbonates pour libérer les métaux
Intestin grêle	**Duodénum**	1,9 m^2	0,35	0,5 à 0,75 heure	4-5,5	Polysaccharides, oligosaccharides, peptidases, lipases, nucléases	La matière organique du sol est dissoute et les contaminants liés à celle-ci sont libérés. Les métaux cationiques sont solubilisés par complexation avec les acides biliaires. Certains métaux sont précipités du fait du pH élevé ou de la teneur en phosphate. Absorption des contaminants libérés de la matrice sol
	Jéjunum	184 m^2	2,8	1,5 à 2 heures	5,5-7,0	Oligosaccharides, peptidases, lipases	
	Iléon	276 m^2	4,2	5 à 7 heures	7,0-7,5	Oligosaccharides, peptidases, nucléases, nucléotidases	
Colon et rectum		1,3 m^2	1,5	1 à 60 heures	7,0-8,0	Large spectre d'enzymes bactériennes	

I.2) Le processus de biodisponibilité orale pour l'homme

Le tractus gastro-intestinal se compose de la bouche, du pharynx, de l'œsophage, de l'estomac, de l'intestin grêle, du colon et du rectum (Minaire et Lambert, 1976). Il comprend également des organes glandulaires (glandes salivaires, foie, vésicule biliaire et pancréas). Le rôle du tractus gastro-intestinal évolue selon la fonction requise dans chaque secteur qui le compose. Chacun des compartiments possède des propriétés anatomiques, biochimiques et physiologiques spécifiques regroupées dans le tableau 1 (Minaire et Lambert, 1976 ; Sips *et al.*, 2001 ; Gron *et al.*, 2003 ; Wragg, 2005). De cette manière, les différents mécanismes de digestion humaine, mettant en jeu des phénomènes physico-chimiques (gradient de pH, temps de résidence dans les compartiments) et biologiques (activité enzymatique), détaillés dans le tableau 1, vont agir sur la matrice contaminée et donc sur la biodisponibilité des éléments présents sur la matrice. En se basant sur le rapport du NRC (National Research Council, 2003) et sur les phénomènes physico-chimiques mis en jeu dans le tractus gastro-intestinal, plusieurs étapes peuvent être décrites pour définir le processus de biodisponibilité orale. La figure 1 détaille ces différentes étapes.

I.2.1) La solubilisation des contaminants

Pour que le contaminant lié à la matrice sol puisse être potentiellement absorbé par les membranes biologiques, il faut qu'il soit libéré (dissocié) de celle-ci (Kelley *et al.*, 2002 ; Dean, 2007). En effet, les contaminants sont liés au sol par différents types de liaisons comme par exemple des liaisons électrostatiques, covalentes ou encore hydrophobiques (Sposito, 1989 ; Alloway, 1995). Par conséquent, en fonction des liaisons mises en jeu et de la taille des particules ingérées, les contaminants seront plus ou moins dissous dans le tractus gastro-intestinal (Ruby *et al.*, 1999 ; Kelley *et al.*, 2002). D'autres paramètres vont également influencer la dissolution des contaminants : le pH des différents compartiments et le potentiel redox (Eh), la concentration critique en micelles de bile, les enzymes digestives, l'état physiologique de l'individu (à jeun ou non) (Gron *et al.*, 2003 ; NRC, 2003).

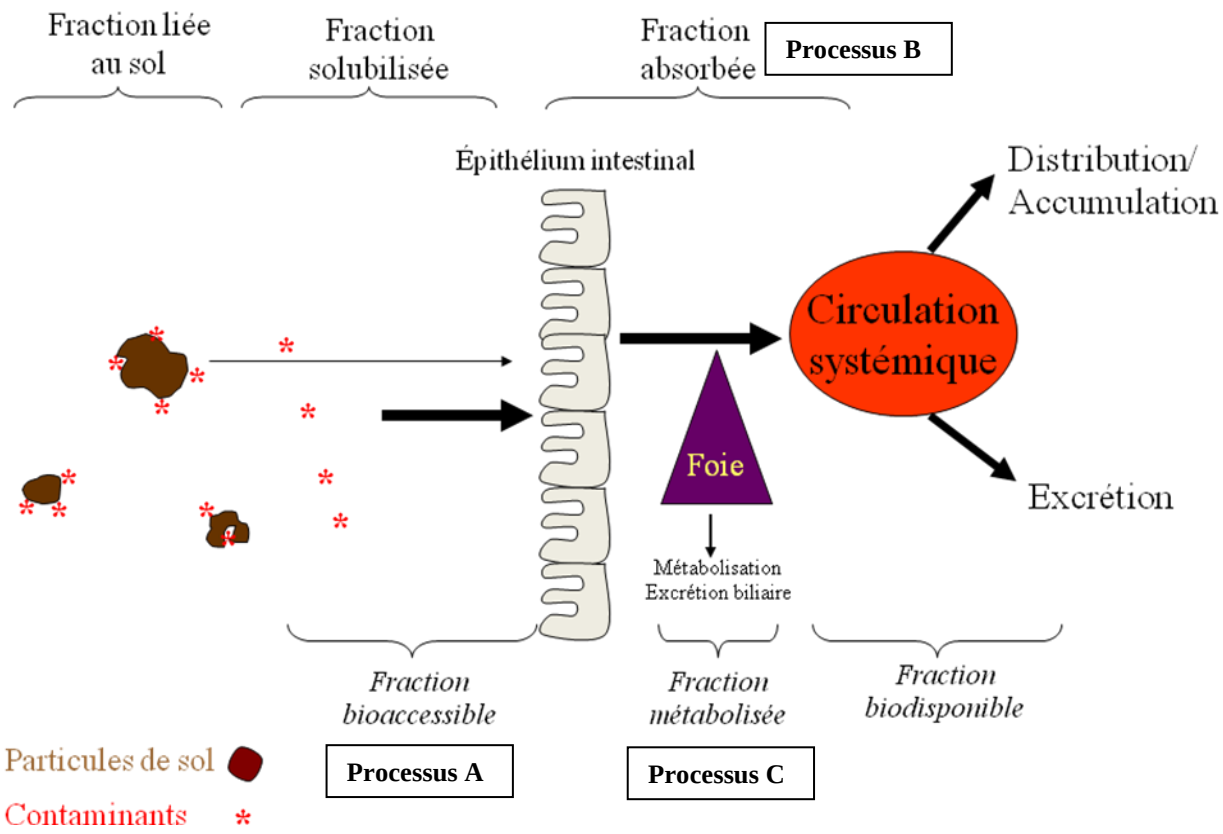


Figure 1 : Modèle conceptuel du processus de biodisponibilité orale

Cette étape de solubilisation (processus A, Figure 1) des contaminants dans le chyme gastro-intestinal peut être définie sous le terme de bioaccessibilité (Hamel *et al.*, 1998 ; Ruby *et al.*, 1999 ; Semple *et al.*, 2004). **Cette étape se déroule à l'intérieur du lumen intestinal**. Les compartiments du tractus gastro-intestinal auront comme premier effet de modifier les liaisons entre le contaminant considéré et la matrice, ce qui permettra de rendre les contaminants potentiellement disponibles pour l'absorption via l'épithélium intestinal.

Les particules de sol ingérées vont se retrouver, dans un premier temps, au niveau de la cavité buccale. En raison de son pH proche de la neutralité (6,5), de son faible temps de résidence (quelques secondes à quelques minutes) et des caractéristiques du sol, le compartiment buccal n'a quasiment pas d'influence sur la dissolution des contaminants de la matrice sol (De Zwart *et al.*, 2001 ; Oomen *et al.*, 2002). Au contraire, dans l'estomac où l'environnement est acide (notamment dans les conditions à jeun, pH entre 1 à 2), la solubilisation des contaminants liés à la matrice sol pourra être réalisée en fonction de la solubilité des minéraux auxquels est lié le contaminant (Oomen *et al.*, 2006). Ruby *et al.* (1999) affirment que la dissolution des contaminants est maximale au niveau de l'estomac et représente ainsi la quantité maximale de contaminant pouvant être absorbée. Par la suite, les contaminants solubilisés au niveau de l'estomac vont être distribués dans le premier segment de l'intestin grêle (duodénum) où le pH augmente sous l'action de sécrétions pancréatique et biliaire pour arriver au final à un pH proche de la neutralité, au niveau de l'iléon (Minaire et Lambert, 1976 ; Charman *et al.*, 1997). Au sein de l'intestin grêle, les contaminants solubilisés pourront réagir avec les composés du chyme[3] et également avec les produits issus des sécrétions pancréatique et biliaire (micelles de bile, phosphates) (Oomen *et al.*, 2003b ; Marshner *et al.*, 2006). Ainsi, suite à l'augmentation du pH, des réactions de précipitation sont observées diminuant le taux de contaminants solubilisés et disponibles pour l'absorption via l'épithélium intestinal (Ruby *et al.*, 1992, 1996 ; Oomen, 2000 ; Oomen *et al.*, 2003b). Les études montrent que les contaminants cationiques sont plus sensibles à l'élévation du pH au niveau de l'intestin grêle que les éléments anioniques (Ruby *et al.*, 1999 ; Schroder *et al.*, 2003 ; Oomen *et al.*, 2006).

Si les contaminants du sol ne sont pas dissociés de la matrice durant le transit gastro-intestinal, et plus particulièrement au niveau de l'estomac, ils sont considérés comme non

[3] Chyme : Mélange semi-liquide élaboré dans l'estomac constitué par les éléments de la matrice ingérée qui ont été digérés.

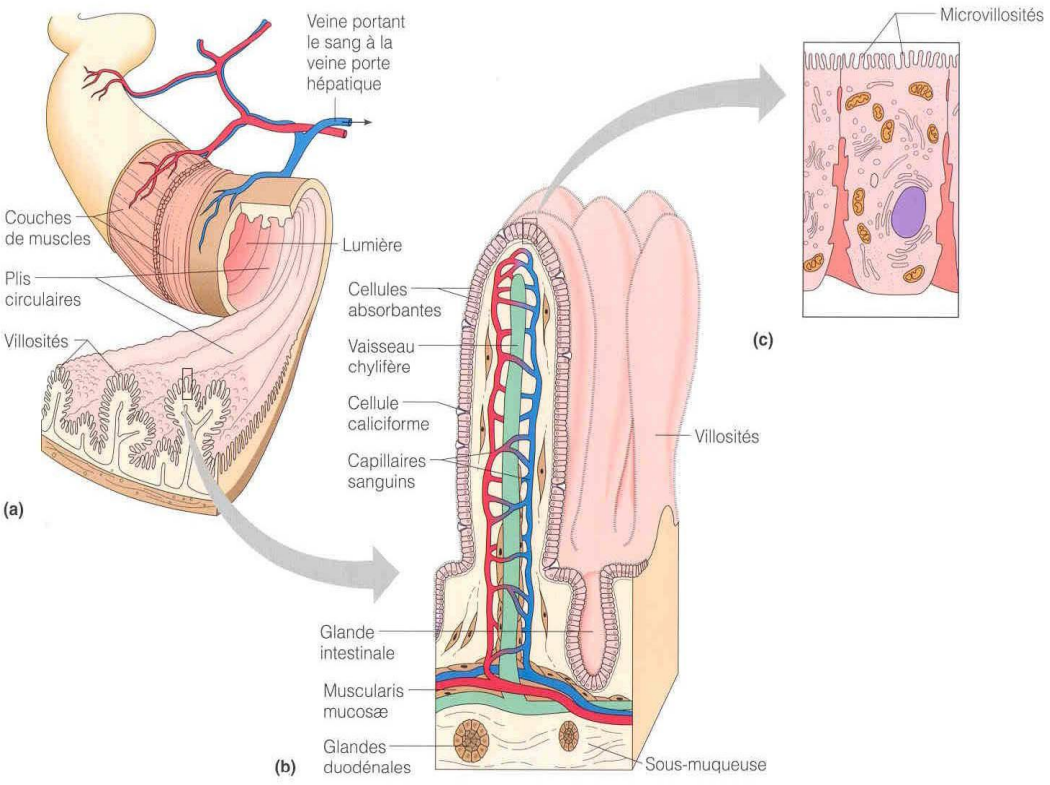


Figure 2 : Structure de l'intestin grêle : amplification de la surface d'échange

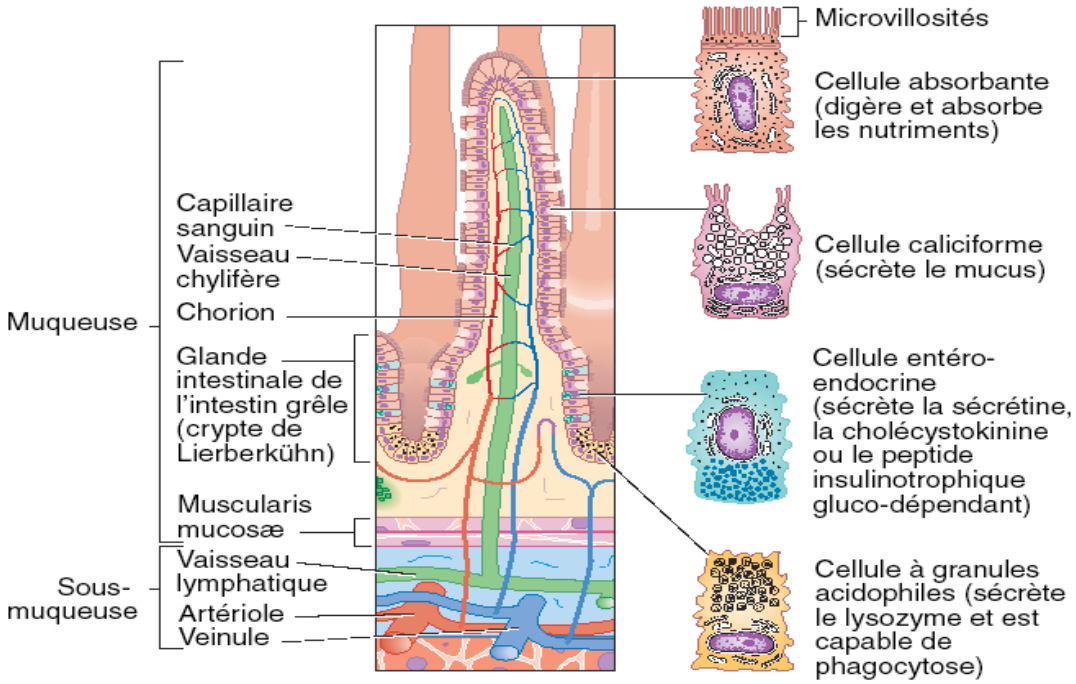


Figure 3 : Agrandissement d'une villosité montrant un vaisseau chylifère, des capillaires, une glande intestinale et certains types de cellules de la muqueuse *(Versantvoort et al., 2000)*

absorbables (Ruby *et al.*, 1999 ; NRC, 2003). **Ce modèle conceptuel équivaut au postulat suivant : le passage en solution du contaminant est l'étape limitante de la biodisponibilité**. Il est donc considéré que la fraction bioaccessible, telle que mesurée par des tests *in vitro*, représente la fraction maximale de contaminant qui peut être absorbée au travers de la membrane gastro-intestinale (Ruby *et al.*, 1999 ; Oomen *et al.*, 2002 ; Oomen *et al.*, 2006).

I.2.2) L'absorption des contaminants

Une fois le contaminant en solution, ce dernier pourra être absorbé. Le passage des composés du chyme au travers des membranes de l'épithélium intestinal est représenté par le processus B sur la figure 1.

I.2.2.1) L'intestin grêle

L'intestin grêle est une structure tubulaire spécialisée dont la longueur chez l'adulte est voisine de 5 mètres (Charman *et al.*, 1997 ; Hidalgo *et al.*, 2001). Il se compose de 3 parties présentant des caractéristiques structurales et fonctionnelles propres : le duodénum (il sécrète des enzymes digestives et reçoit les sécrétions hépatique et pancréatique), le jéjunum (il sécrète des enzymes digestives et absorbe les nutriments) et l'iléon (il absorbe les aliments digérés) (Vanservoort *et al.*, 2000 ; Hidalgo *et al.*, 2001) (Tableau 1). C'est essentiellement l'intestin grêle qui est le site d'absorption des éléments métalliques dont le plomb, le cadmium, l'arsenic et l'antimoine (Mushak, 1991 ; ATSDR, 1992 ; Oomen *et al.*, 2002 ; ATSDR, 2007a, 2007b, 2008). Il y a plusieurs raisons à cela :

- la grande capacité d'absorption de l'intestin grêle est liée à sa structure (Minaire et Lambert, 1976 ; Doherty et Charman, 2002) (Figures 2 et 3). Celle-ci peut être représentée comme une superposition des valvules, villosités et microvillosités dont la surface d'échange atteint environ 200 m^2 (De Sesso et Jacobson, 2001 ; De Zwart *et al.*, 2001) ;

- l'existence de villosités animées de mouvements créant des variations de pression favorisant l'absorption (Vanservoort *et al.*, 2000) ;

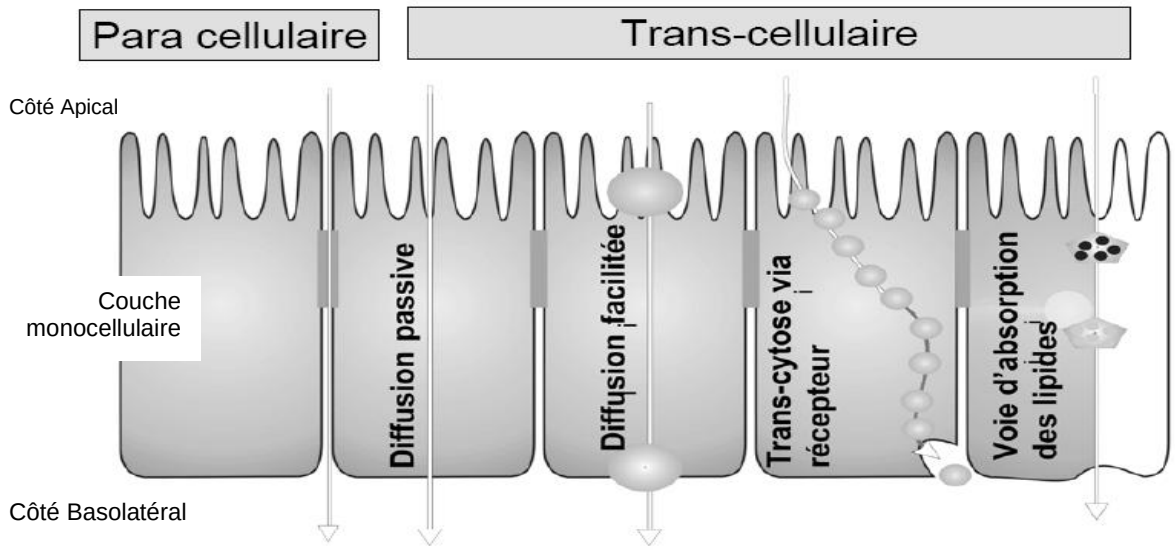


Figure 4 : Présentation des différents mécanismes d'absorption au travers de la membrane de l'épithélium intestinal

- la présence des entérocytes, cellules constitutives de l'épithélium des villosités, qui sont en charge de l'absorption (Figures 2 et 3) (Oomen, 2000 ; Vanservoort *et al.*, 2000) ;
- le temps de résidence de quelques heures au sein de ce compartiment favorise l'absorption des composés du chyme vers la circulation sanguine (Vanservoort *et al.*, 2000 ; De Zwart *et al.*, 2001).

I.2.2.2) L'absorption des éléments métalliques

Pour pénétrer dans l'organisme et atteindre l'organe cible, une substance doit franchir plusieurs obstacles dont la membrane et les cellules de l'épithélium intestinal. Les différentes voies d'absorption des contaminants sont résumées sur la figure 4 (ATSDR, 2007b). Au niveau du tractus gastro-intestinal, les mécanismes d'absorption sont :

- **la diffusion paracellulaire** à travers les jonctions intercellulaires. Le transport via la voie paracellulaire est réservé aux petites molécules hydrophiles du fait de la présence de ponts imperméables entre les cellules ;

- **le transport transcellulaire par diffusion passive** à travers la couche lipidique ou les pores des membranes cellulaire (gradient de diffusion) ;

- **le transport transcellulaire par diffusion facilitée**. Le passage d'une substance peut être facilité par l'existence de transporteurs membranaires (échange) ;

- certaines substances sont activement transportées à travers les membranes cellulaires, on parle alors de **transport actif**. Ce transport s'effectue par l'intermédiaire de protéines. Ce mode d'absorption s'apparente à la diffusion facilitée, mais il peut se produire contre un gradient de concentration. Il requiert un apport d'énergie ;

- **l'endocytose** est un mécanisme de transport au cours duquel la membrane cellulaire enveloppe le composé pour former une vésicule pénétrant dans la cellule.

Les mécanismes de transport peuvent être différents en fonction de la forme des contaminants (libre, compléxé) et de leurs propriétés spécifiques (pKa, état de valence) (Diamond *et al.*, 1997). Par exemple, pour les éléments métalliques, le cadmium peut être absorbé à la fois par diffusion paracellulaire passive et par diffusion transcellulaire passive (EPA, 1999 ; ATSDR, 2008). Le cadmium est transporté dans le sang par fixation à l'hémoglobine ou aux métallothionéines (ATSDR, 2008). Le plomb, quant à lui, utilise principalement le système de transport spécialisé du calcium par la voie transcellulaire (transport facilité selon un gradient de concentration) au niveau du duodénum (ATSDR, 2007b). Ceci explique en partie les phénomènes de compétition pour l'absorption entre le calcium et le plomb (Bronner *et al.*, 1986). Mais, le plomb peut également être absorbé par la voie paracellulaire si la concentration en contaminant est très élevée (Gron *et al.*, 2003 ; ATSDR, 2007b).

Pour résumer, en fonction de ses différents mécanismes et des caractéristiques de chaque contaminant, les ETM auront des taux d'absorption différents. Les études de toxicité orale ayant utilisé des sels solubles pour caractériser l'absorption montrent que :

- pour le plomb, l'absorption gastro-intestinale chez l'enfant a été estimée entre 40 à 50% (Ziegler *et al.*, 1978 ; ATSDR, 2007b) ;
- pour le cadmium, l'absorption est d'environ de 5 % à 10% (EPA, 1999) ;
- l'arsenic est un élément fortement absorbé chez l'homme, environ à 95% (Roberts *et al.*, 2002 ; ATSDR, 2007a) ;
- pour l'antimoine des taux d'absorption de 5 à 20% ont été mesurés chez les animaux (Waitz *et al.*, 1965 ; ATSRD, 1992 ; Poon *et al.*, 1998).

Ces données montrent que même pour des formes solubles (totalement disponibles pour l'absorption), l'absorption n'est pas totale et peut être même très faible, en particulier pour le cadmium et l'antimoine. De plus, les taux d'absorption pour chacun des contaminants, peuvent être différents en fonction des propriétés physico-chimiques de la forme sous laquelle ils se trouvent (matrice ingérée, spéciation, pKa[4]), des phénomènes de compétition vis-à-vis des transporteurs intestinaux, des propriétés des cellules intestinales et de l'état physiologique (âge, présence de nourriture, carence en éléments tels que le fer pou le calcium...) de

[4] En chimie, le pKa est une constante d'équilibre qui caractérise l'état d'équilibre d'une réaction. Elle représente donc un état qui ne peut pas évoluer de manière spontanée. La valeur de la constante d'équilibre dépend uniquement de la réaction chimique considérée et de la température.

l'individu exposé (NRC, 2003 ; ATSDR, 2007b ; USEPA, 2007). Ainsi, les processus détaillés ci-dessus montrent que l'absorption des ETM présents dans les sols est soumise à leur solubilisation dans le tractus digestif et qu'en fonction de nombreux facteurs une fraction plus ou moins importante de contaminants solubilisés pourra être absorbée par les parois de l'épithélium intestinal.

I.2.3) Fraction de composé atteignant la circulation systémique

Une dernière étape peut être décrite dans le processus de biodisponibilité orale. En effet, le phénomène C présenté sur la figure 1 correspond au devenir du composé suite à l'absorption par les membranes intestinales. Au niveau du foie, le composé peut subir l'effet de premier passage[5] (excrétion via la bile) (RIVM, 2001, NRC, 2003). Cet effet de premier de passage pourra avoir un impact important sur le processus de biodisponibilité orale dans le cas des contaminants organiques (Oomen *et al.*, 2003). Cependant, pour les éléments métalliques étudiés, le phénomène de premier passage dans le foie est faible (Oomen *et al.*, 2006). De ce fait, la fraction absorbée par l'épithélium intestinal est quasiment similaire à la fraction de composé qui atteint la circulation systémique (Oomen *et al.*, 2006). Ainsi, comparé aux autres processus que sont la solubilisation et l'absorption des contaminants, l'impact de l'effet de premier passage sur la biodisponibilité des éléments métalliques ne représentera pas une étape limitante (Kelley *et al.*, 2002 ; Oomen *et al.*, 2002 ; Oomen *et al.*, 2006). Finalement, la fraction de contaminant absorbée et non métabolisée pourra être distribuée puis accumulée dans les organes cibles afin d'exercer sa toxicité ou alors être excrétée, principalement via l'urine.

Pour résumer, dans le cadre de l'ingestion de sol, la biodisponibilité orale est définie comme la quantité de contaminant absorbée par la circulation systémique. Trois processus permettent de décrire la biodisponibilité orale : la bioaccessibilité, l'absorption et l'effet de premier passage des contaminants dans le foie qui peut être considéré comme très faible pour les éléments métalliques. L'étape de bioaccessibilité est le seul processus qui se déroule dans le lumen gastro-intestinal. Cette étape est fortement dépendante des caractéristiques physico-chimiques du sol qui peuvent contrôler les processus tels que la mobilisation, la complexation et la désorption des contaminants et ainsi affecter leur biodisponibilité dans les sols.

[5] On appelle effet de premier passage l'extraction par le foie d'une substance présente dans le sang portal. Lorsque cette extraction est totale ou presque totale, cette substance n'apparaît pas ou presque pas dans la circulation générale quand elle est administrée par voie orale.

II.) Les facteurs influençant la bioaccessibilité et la biodisponibilité des ETM

De nombreux facteurs peuvent influencer la biodisponibilité des ETM dans les sols. Premièrement, il peut y avoir un impact du sol sur la solubilisation des ETM au sein du tractuc digestif en fonction des interactions entre les éléments métalliques et les constituants du sol, de l'âge ou encore de la source de contamination. De plus, les facteurs édaphiques comme le pH et les teneurs en matière organique (MO) et en minéraux argileux (MA), principaux déterminants de la capacité d'échange cationique d'un sol, sont les facteurs les plus cités comme pouvant influer sur les valeurs de biodisponibilité des ETM dans les sols (Alloway, 1995 ; Baize, 1997). Deuxièmenent, selon l'état physiologique de l'individu exposé (âge, état à jeun, état nutritionnel), les valeurs de biodisponibilité des ETM dans les sols peuvent varier. Il est ainsi apparu primordial d'introduire à ce stade, le comportement des éléments métalliques au sein de la matrice sol et de mettre en évidence les interactions et les phénomènes mis en place au sein de cette matrice qui sont susceptibles de limiter la solubilisation et donc potentiellement la biodisponibilité orale des contaminants présents dans le sol (Oomen *et al.*, 2006).

II.1) Facteurs influençant la bioaccessibilité

II.1.1) Interactions des ETM avec les constituants de la matrice sol

Le sol constitue une interface entre la roche, l'atmosphère et l'hydrosphère. Il s'est formé à partir des roches et comprend des constituants secondaires minéraux ou organiques dotés de propriétés spécifiques (Alloway, 1995). Le sol est un milieu très complexe où il est possible de distinguer, pour la fraction solide, une partie minérale dite "inerte" constituée essentiellement des minéraux primaires (quartz, felsphaths, micas), qui proviennent de la roche mère, et une partie minérale dite "active" constitutée des argiles, d'oxydes et hydroxydes métalliques. Le sol se compose également d'une fraction organique (organismes vivants, débris végétaux et animaux, humus). Au sein de la fraction minérale, les principaux composés susceptibles de retenir les éléments métalliques sont les argiles, les carbonates, les

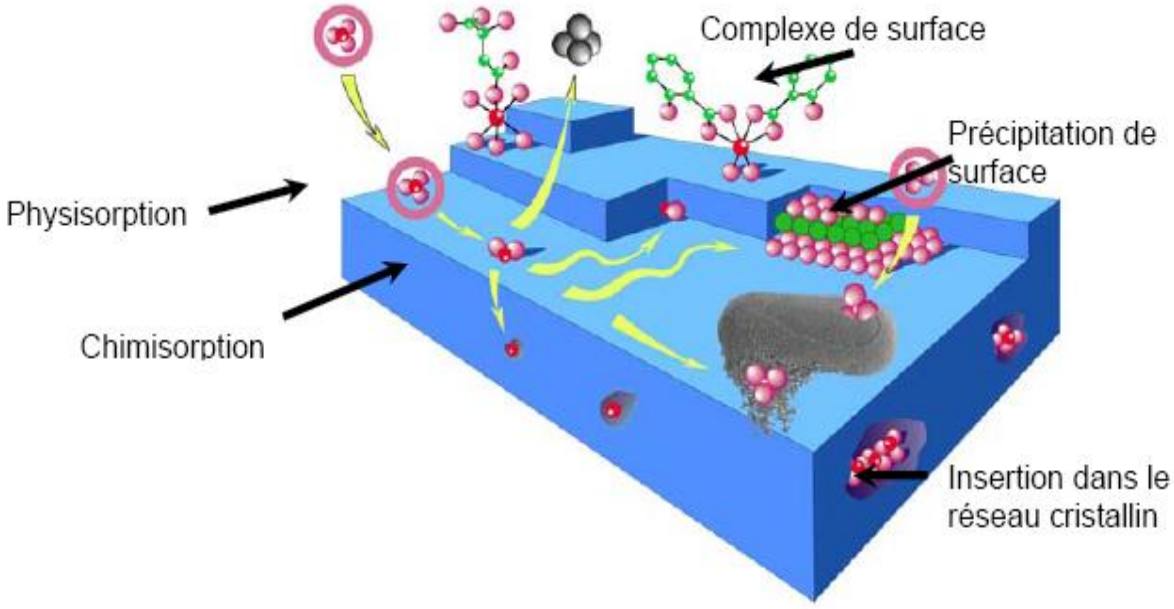


Figure 5: Schématisation des différents processus de sorption se présentant entre un élément trace métallique et la matrice sol (d'après Manceau et al., 2002)

oxydes et hydroxydes de fer, d'aluminium et de manganèse (Baize, 1997 ; Cahier du club CRIN, 1999). Ces différents constituants peuvent interagir avec les éléments métalliques présents dans le sol, ce qui permet de les rendre moins mobiles et ainsi moins disponibles par rapport aux autres matrices (eau, nourriture) (Ruby *et al.*, 1999 ; Smith *et al.*, 2008).

L'âge de la contamination d'un sol peut influencer la biodisponibilité des ETM dans les sols. McLaughin *et al.* (2000) estiment que la mobilité et la biodisponibilité des ETM dans les sols diminuent au cours du temps. En effey, plusieurs travaux ont permis de mettre en évidence que les contaminants présents dans les sols tendent à y être séquestrés avec le temps (Stewart *et al.*, 2003 ; Fendorf *et al.*, 2004 ; Juhasz *et al.*, 2007a). Après leur dépôt, les contaminants interagissent avec les particules du sol et subissent un processus de maturation qui consiste principalement en des phénomènes d'adsorption mais également de piégeage dans les micropores du sol ou dans la matière organique (Yang *et al.*, 2002 ; Lu *et al.*, 2005 ; Jushasz et al., 2007a). Ces substances séquestrées deviennent alors potentiellement moins mobiles et moins disponibles (Davids *et al.*, 1993; Juhasz *et al.*, 2008). Ainsi, plusieurs auteurs montrent que, dans la majorité des cas, les contaminants présents dans les sols caractéristiques de zones natuelles sont moins bioaccessibles que des contaminants présents dans des sols de zones anthropiques (retombées atmosphériques) (Ruby *et al.*, 1999 ; Rieuwerts *et al.*, 2000 ; Smith *et al.*, 2008). Les auteurs justifient cette différence d'accessibilité en s'appuyant sur des processus de « maturation-séquestration » et indiquent que des formes généralement moins extractibles sont présentes dans les sols caractéristiques de zones naturelles. Ainsi, les différents constituants du sol pourront être décrits comme des phases porteuses[6] des différents éléments métalliques permettant plus ou moins de les immobiliser ; ceci en fonction des phénoménes de liaisons développés (adsorption spécifique ou non, échange ionique, précipitation, co-précipitation ou complexation) (Evans, 1989 ; McBride, 1989 ; Sposito, 1989). Ces phénomènes d'interactions entre les éléments métalliques et les constituants minéraux et organiques du sol sont généralement regroupés sous le terme de **spéciation**.

[6] La phase porteuse correspond au support minéral ou organique dans laquelle se trouve un élément chimique.

Tableau 2 : Impact de l'historique de contamination et de certains paramètres physico-chimiques du sol sur la biodisponibilité des éléments métalliques dans les sols

	Biodisponibilité des ETM		
	Faible	**Moyenne**	**Forte**
Forme géochimique			
Sulfures	×		
Elémentaire (métal)	×		
Sulfates		×	
Carbonates			×
Oxydes			×
Taille des particules (phases porteuses des métaux)			
Petite			×
Grande	×		
Age de contamination			
Sulfures	× →		
Elémentaire (métal)	× →		
Carbonates		←	×
Oxydes		←	×
Chimie des sols			
pH acide		×	
pH basique			×
Sols alcalins			×
Forte teneur en matière organique			
Forte teneur en agents complexant (Fe, Mn, Si)		×	

II.1.2) Influence de la spéciation et des propriétés physico-chimiques du sol

Originellement, le terme de spéciation définit l'état de valence d'un composé (Pb^{2+}, Cd^{2+}, $As^{3+,}$ $As^{5+,}$ Sb^{3+}) et vise à définir les modes d'associations entre anions et cations en solution (Conil et clozel, 1999). Par extension, cette notion a été étendue, en science du sol, à l'étude des modes d'associations et de localisation des cations ou anions sur, ou dans la matrice (Conil et Clozel, 1999). Ici, la **spéciation** sera définie comme **l'étude des différentes formes chimiques et de leur mode de fixation sur les phases solides du milieu, appelées phases porteuses** (argiles, matières organiques, carbonates, oxyhydroxydes de fer, de manganèse, d'aluminium…) (Cahier du club CRIN, 1999). **Afin d'éviter toute confusion, dans la suite du rapport, le terme de distribution du contaminant au sein des phases porteuses du sol sera utilisé et non le terme de spéciation au sens strict.**

Pour estimer la distribution des éléments traces métalliques sur les phases porteuses dans les sols, différentes méthodes physiques (DRX, EXAFS, MEB-EDS) et chimiques (extractions séquentielles) peuvent être utilisées (Reeder *et al.*, 2006). Les dynamiques de dissolution, précipitation, fixation, désorption résultent de mécanismes abiotiques et biotiques, qui concernent soit directement les éléments eux-mêmes soit leurs phases porteuses. Ces différentes interactions sont regroupées sur la figure 5. **Les éléments métalliques dans les sols vont se présenter sous un mélange complexe de phases solides et de morphologie différentes**. Ainsi, un élément métallique donné pourra se trouver associé à de nombreuses phases porteuses dans les sols et toutes ses formes n'auront pas le même taux d'absorption au travers de l'épithélium intestinal (Ryan *et al.*, 2001 ; Oomen *et al.*, 2006 ; USEPA, 2007b). Par exemple le plomb et l'arsenic, qui sont les deux éléments métalliques les plus étudiés, ont une forte capacité de réaction avec les constituants du sol et pourront ainsi être retrouvés sous de nombreuses formes dans les sols (Rieuwerts *et al.*, 1998 ; BRGM, 2004(a), 2004(b) ; Basso *et al.*, 2007). Ruby *et al.* (1999) montrent que la biodisponibilité du plomb et de l'arsenic suite à l'ingestion de terre dépend de la distribution sur les phases porteuses mais également de la taille des particules ingérées et de «l'encapsulation» des phases minéralogiques au sein de la matrice. Le tableau 2 synthètise, de manière générale à l'ensemble des éléments métalliques, l'impact de l'historique du site et des paramètres physico-chimiques du sol sur la biodisponibilité.

Ainsi, ce tableau montre qu'en fonction de la phase minéralogique à laquelle les métaux sont liés, la biodisponibilité peut être différente (Davis *et al.*, 1997 ; Ruby *et al.*, 1999). Par exemple, le carbonate de plomb est mieux absorbé que le plomb administré sous forme de nitrate de plomb ou d'oxydes de plomb eux-mêmes mieux absorbés que le plomb sous forme de sulfures (Dieter *et al.*, 1993 ; Sips *et al.*, 2001 ; USEPA, 2004). Gasser *et al.* (1996) montrent que les taux et les constantes de dissolution du plomb sous des conditions simulant l'environnement gastrique sont dépendants de la spéciation de l'élément dans les sols. Ainsi, les phénomènes de sorption des ETM sur des phases insolubles, qui peuvent être irréversibles, sont donc des processus importants dans la diminution de la bioaccessibilité et de la biodisponibilité (Ruby *et al.*, 1992, 1996 ; Davis *et al.*, 1997).

De nombreuses études dans la littérature montrent que la variation de la distribution des éléments métalliques sur les phases porteuses du sol dépendra de la variation de nombreux paramètres physico-chimiques comme : le pH des sols, le taux de matières organiques, la concentration en colloïdes inorganiques, en oxydes de fer, de manganèse, d'aluminium (Sauvé *et al.*, 2000; Appel *et al.*, 2002 ; Stewart *et al.*, 2003). En effet, ces différents paramètres influent sur divers mécanismes physico-chimiques et biologiques pouvant intervenir pour solubiliser, précipiter, concentrer les éléments métalliques présents dans le sol (Sposito, 1989, Manceau *et al.*, 2002). Par exemple, la plupart des ETM sont plus mobiles en conditions acides qu'en conditions alcalines car la liaison des ETM à la phase solide du sol (par différents mécanismes : adsorption, précipitation,…) augmente avec le pH (Alloway, 1995). De façon générale également, les sites chargés négativement portés par les groupements phénol ou carboxyl de la matière organique (MO) permettent une complexation des ETM. La MO joue donc un rôle important dans la partition phase liquide – phase solide des ETM. La diminution des teneurs en MO dans les sols conduit a une augmentation des concentrations en ETM solubles pour le Cd (Crommentuijn *et al.*, 1997). Le tableau 2 résume le rôle de certains paramètres physico-chimiques du sol sur la biodisponibilité. Par exemple, en se basant sur ce tableau, un contaminant présent dans un sol acide sous forme de carbonates et sorbé à des fines particules sera fortement biodisponible en raison de sa facilité à se dissoudre au sein du tractus gastro-intestinal et donc de sa facilité à être accessible pour l'absorption par l'épithélium intestinal. De nombreux auteurs se sont intéréssés à la prédiction de la bioaccessibilité des ETM, plus particulièrement de l'arsenic, à partir des propriétés physico-chimiques (Yang *et al.*, 2002 ; Bradham et al., 2005 ; Datta *et al.*, 2005 ; Sarkar *et al.*,

2007b ; Smith *et al.*, 2008). La teneur en matière organique et le pH du sol sont citées comme les principaux facteurs de variation de la bioaccessibilité des contaminants dans les sols (Ruby *et al.*, 1999 ; Oomen *et al.*, 2006). Mais d'autres caractéristiques comme la taille des particules, la teneur en argiles (en raison de la grande surface de contact), la présence d'agents complexants (oxy-hydroxydes de fer, de manganèse) ou encore la capacité d'échange cationique sont cités comme pouvant influencer la bioaccessibilité des ETM dans les sols (Yang *et al.*, 2002 ; Ljung, 2005 ; Sarkar *et al.*, 2007a). Par exemple, Yang *et al.* (2002) ont démontré que la bioaccessibilité de l'arsenic pouvait être prédite par les valeurs de pH et de la concentration totale en fer dans les différents sols. Ces différentes études seront plus largement décrites dans le chapitre 4 du document. En effet, dans l'optique de comprendre la possible variation de la bioaccessibilité des ETM dans les sols, ces différents paramètres seront à prendre à compte.

En résumé, selon les propriétés physico-chimiques et de la nature du sol, différents mécanismes de liaisons pourront être mis en place. En fonction de la distribution des métaux sur les phases porteuses du sol, la dissolution des éléments métalliques dans le tractus digestif, c'est-à-dire la bioaccessibilité pourra être plus ou moins faible comparée à une espèce métallique totalement soluble dans une matrice telle que l'eau. Par conséquent, la distribution des éléments métalliques sur les phases porteuses du sol est un facteur important dans la compréhension du processus de biodisponibilité orale suite à l'ingestion de terre.

II.2) Facteurs influençant l'absorption

Au-delà de la nature de la matrice ingérée (dans notre cas le sol), les conditions physiologiques du tractus gastro-intestinal vont pouvoir influencer l'absorption des ETM et ainsi la biodisponibilité orale des contaminants. En effet, les conditions physiologiques et physico-chimiques du tractus digestif varient dans l'espace et le temps, et notamment selon l'état physiologique de l'individu exposé (âge, état à jeun, état nutritionnel en calcium et en fer) (Fullmer, 1996 ; De Zwart *et al.*, 2001 ; Oomen *et al.*, 2006).

II.2.1) Influence de l'âge sur l'absorption des contaminants

Les influences de l'âge et de l'état physiologique de l'individu sur l'absorption des ETM sont documentées par de nombreuses études depuis plusieurs années. Ces études indiquent que les enfants ont une vulnérabilité aux composés chimiques supérieure à celle des adultes (Mushak, 1991 ; Guzelian *et al.*, 1992 ; NRC, 1993). Par exemple, l'absorption gastro-intestinale de plomb soluble dans l'eau apparaît comme étant plus forte chez les enfants que chez les adultes. En effet, les études conduites chez les nourrissons et les enfants (deux semaines à huit ans) montrent que le plomb ingéré est approximativement absorbé à 40-50% (Alexander *et al.*, 1974 ; Ziegler *et al.*, 1978). Chez l'adulte, l'estimation de l'absorption de composés de plomb solubles dans l'eau (chlorure de plomb, nitrate de plomb, acétate de plomb) varie de 3 à 10% (Rabinowitz *et al.*, 1980 ; Heard et Chamberlain 1982). Ces différences d'absorption peuvent s'expliquer par des différences pharmacocinétiques et métaboliques entre l'enfant et l'adulte. Par exemple, la différence d'absorption peut être liée à un processus de maturation selon lequel l'intestin perd sa capacité d'ingestion des particules par pinocytose[7] (Venugopal *et al.*, 1974). De plus, plusieurs enzymes métabolisant les contaminants ont des actions distinctes en fonction du stade de développement. Les taux d'enzymes chez les enfants peuvent également être plus ou moins importants par rapport à ceux des adultes (Leeder et Kearns, 1997). Finalement, cette différence peut être liée également à une absorption facilitée du calcium chez les enfants (Mahaffey *et al.*, 1980 ; Bronner et al., 1986 ; ATSDR, 2008b).

II.2.2) Influence de l'état nutritionnel sur les paramètres du tractus gastro-intestinal

Les phénomènes d'absorption peuvent être modifiés par l'état nutritionnel de l'individu. Par exemple, plusieurs composés présents dans la nourriture peuvent entrer en compétition avec les éléments métalliques et ainsi limiter leur absorption au niveau de l'épithélium intestinal. La compétition la plus connue est l'impact du calcium sur l'absorption du plomb (Ziegler *et al.*, 1978 ; Mahaffey *et al.*, 1986). Mais d'autres composés tels que le fer ou le zinc peuvent également limiter l'absorption intestinale du plomb ou encore du cadmium (Mahaffey *et al.*, 1986 ; Marcus et Schwartz, 1987 ; Flora *et al.*, 1989).

[7] La pinocytose est une forme d'endocytose permettant le transport de liquide extracellulaire vers l'intérieur de la cellule. La membrane plasmique de la cellule s'invagine et forme une vésicule (caveolae) contenant une goutelette de liquide extracellulaire.

Au-delà de l'apport de calcium, de fer et de zinc par la nourriture, les paramètres physiologiques des différents compartiments, présentés dans le tableau 1, peuvent varier en fonction de la présence ou non de nourriture dans le tractus gastro-intestinal (Rabinowitz *et al.*, 1980 ; Sips *et al.*, 2001). Une différence importante est que le pH gastrique est plus faible pour un état à jeun. Il se situe, pour un enfant, entre 1 et 2 pour l'état à jeun alors qu'il peut être supérieur à 5 après un repas (De Zwart *et al.*, 1999). De même, le pH (5,5 à 7,5) et le temps de transit intestinal (2 à 5 H) sont fortement affectés par la présence de nourriture (De Zwart *et al.*, 1999). Ces différences de valeurs dans les paramètres physiologiques sont à prendre en compte car elles vont influencer la dissolution et l'absorption des éléments métalliques (Oomen *et al.*, 2006). Par exemple, Rabinowitz *et al.* (1980) reportent que, chez les hommes adultes, le plomb ingéré sans nourriture est absorbé à 35% alors que la même quantité de plomb ingéré avec de la nourriture est absorbée à 8,2%. De même, l'USEPA a démontré que l'absorption de l'acétate de plomb chez le porcelet est réduite de moitié lorsque le plomb est administré avec de la nourriture ou deux heures après un repas par rapport au plomb administré dans des conditions à jeun (USEPA, 2007b).

Pour résumer, ces différentes données montrent que la détermination de la biodisponibilité des ETM suite à l'ingestion de sol doit être réalisée pour des modèles animaux représentatifs de la physiologie infantile. De plus, il est important de déterminer la biodisponibilité pour des conditions à jeun dans le but d'obtenir une valeur maximale d'absorption et de simplifier les systèmes d'études (*in vivo* et *in vitro*) en évitant les interactions entre le bol alimentaire et les contaminants vis-à-vis de l'absorption.

III.) Mesure de la biodisponibilité

L'estimation de la biodisponibilité orale, telle que définie dans le cadre de l'étude, nécessite des mesures sur des modèles animaux afin d'estimer la fraction de contaminant réellement absorbée par la circulation systémique (Kelley *et al.*, 2002 ; McGeer *et al.*, 2004). Plusieurs méthodes peuvent être envisagées pour estimer la biodisponibilité et deux notions en particulier peuvent être distinguées :

III.1) La biodisponibilité absolue

III.1.1) Définition de la biodisponibilité absolue

La biodisponibilité absolue (BA) est la fraction de composés ingérés qui est absorbée et atteint la circulation systémique (Kelley *et al.*, 2002). Ainsi, la biodisponibilité absolue correspond au rapport de la dose interne sur la dose externe du contaminant auquel un organisme est exposé. En d'autre mot, elle correspond au rapport entre la dose absorbée sur la dose administrée (Basta et Gradwhol, 2000 ; Ruby *et al.*, 1996) (
Équation 1) :

$$\text{Biodisponibilité absolue (\%)} = \frac{\text{dose absorbée}}{\text{dose administrée}} * 100$$

Équation 1 : Détermination de la biodisponibilité absolue

III.1.2) Mesure de la biodisponibilité absolue

La mesure de la biodisponibilité absolue est déterminée par le rapport de la quantité absorbée dans le sang suite à une exposition par voie orale puis administration par voie intra-veineuse (égale à 100% de la dose, par définition). Cette mesure nécessite donc le suivi des cinétiques sanguines. Cette méthode est couramment utilisée dans les études pharmacocinétiques dont les composés testés (les médicaments) sont facilement absorbés (Kelley *et al.*, 2002). Cette approche a également déjà été utilisée pour les éléments métalliques qui sont fortement absorbés comme l'arsenic (Cf. paragraphe I.2.2.2) (Kelley *et al.*, 2002 ; Juhasz *et al.*, 2007b ; USEPA, 2007b). Cependant, cette technique de mesure est difficilement applicable à l'ensemble des éléments métalliques et présente plusieurs inconvénients. En effet, en raison des faibles taux d'absorption de certains éléments métalliques (cadmium et antimoine) et des

interactions avec la matrice sol (qui peuvent limiter l'absorption), les concentrations de ces éléments dans le sang peuvent être très faibles ce qui peut rendre difficile l'estimation de la biodisponibilité absolue. D'autre part, au-delà de la faible absorption de certains contaminants présents dans le sol, l'estimation de la biodisponibilité absolue est difficile à mettre en place d'un point de vue technique. En effet, la démarche nécessite un suivi de la cinétique sanguine et donc des prises de sang à différents temps après l'ingestion. Par conséquent, cette approche est uniquement possible pour les composés ayant une demi-vie dans le sang de quelques heures à quelques jours (McGeer *et al.*, 2004 ; USEPA, 2007b). De plus, les mesures impliquent la possibilité d'acquérir un volume suffisant d'échantillon de sang en vue d'y mesurer les concentrations des éléments ciblés, au regard des exigences analytiques (seuil de quantification notamment). Finalement, en raison des prises de sang quotidiennes, le suivi des cinétiques sanguines requière un savoir-faire expérimental de pointe. Cette technique est donc relativement difficile à mettre en place, notamment sur des modèles comme le porcelet et le singe, pour estimer la biodisponibilité absolue de plusieurs ETM et pour un large nombre de sol. Par conséquent, dans la majorité des études *in vivo* publiées, la biodisponibilité des éléments métalliques suite à l'ingestion de terre contaminée est généralement déterminée de manière relative.

III.2) La biodisponibilité relative

III.2.1) Définition de la biodisponibilité relative

La notion de biodisponibilité relative (BR) vise à comparer l'absorption d'un composé sous deux formes chimiques (par exemple le carbonate de plomb *vs* l'acétate de plomb), ou d'un composé, sous une forme identique, administré par différentes matrices (tels que la nourriture, le sol ou l'eau) (Kelley *et al.*, 2002 ; USEPA, 2004).

$$\text{Biodisponibilité relative (\%)} = \frac{\text{dose absorbée via un sol}}{\text{dose absorbée via une forme de référence totalement soluble}} * 100$$

Équation 2 : Détermination de la biodisponibilité relative

De ce fait, la biodisponibilité relative est très importante dans le cadre de notre étude étant donné que celle-ci permettra de mettre en évidence l'impact de la matrice sol sur l'absorption des contaminants par rapport à une forme de référence choisie pour être totalement disponible (soluble) pour l'absorption (

Équation 2) (Semple *et al.*, 2004 ; USEPA, 2004 ; Van de Wiele, 2005).

Tableau 3 : Principales études in vivo publiées déterminant la biodisponibilité relative des éléments traces métalliques dans les sols

Modèle in vivo	Compartiment(s) cible(s)	Forme de référence	Contaminant/ Nombre de sols	Valeurs de Biodisponibilité Relative (BR)	Référence
Lapin	Urine	Arséniate de sodium	Arsenic/1	48%	Freeman *et al.*, 1993
	Sang	Acétate de plomb	Plomb/1	9%	Ruby *et al.*, 1993
Rat	Sang	Acétate de plomb	Plomb/4	9,3% à 45%	Ruby *et al.*, 1996
	Sang, foie, reins et os	Acétate de plomb	Plomb/4	18,6% à 47,7%	Hettiarachchi *et al.*, 2003
	Sang, reins, foie	Chlorure de cadmium	Cadmium/1	43%	Schilderman *et al.*, 1997
Singe	Urine	Arséniate de sodium	Arsenic/2	20%-28%	Freeman *et al.*, 1995
	Urine	Arséniate de sodium	Arsenic/5	10,7% à 24,7%	Roberts *et al.*, 2002
	Urine	Arséniate de sodium	Arsenic/14	5% à 31%	Roberts *et al.*, 2006
Porcelet	Sang, foie, reins et os	Arséniate de sodium	Arsenic/15	4% à 43%	Rodriguez *et al.*, 1999
	Urine	Arséniate de sodium	Arsenic/21	8% à 61%	USEPA, 2005
	Sang	Arséniate de sodium	Arsenic/12	7% à 75%	Juhasz *et al.*, 2007b
	Sang, foie, reins et os	Arséniate de sodium	Arsenic/9	2% à 35%	Basta *et al.*, 2007
	Reins	Chlorure de cadmium	Cadmium/10	10,4% à 116%	Schroder *et al.*, 2003
	Sang, foie, reins et os	Acétate de plomb	Plomb/2	56% à 86%	Casteel *et al.*,1997
	Sang, foie, reins et os	Acétate de plomb	Plomb/5	17% à 63%	Marshner *et al.*, 2006
	Sang, foie, reins et os	Acétate de plomb	Plomb/19	1% à 105%	Casteel *et al.*, 2006 ;USEPA, 2004, 2007b ; Drexler *et al.*, 2007

III.2.2) Mesure de la biodisponibilité relative

Le principe de la technique est d'exposer les animaux à des doses similaires d'un contaminant provenant à la fois d'un sol et d'une forme de référence. En générale, les formes de référence utilisées dans la littérature sont des sels totalement solubles afin de comparer l'impact de la matrice sol par rapport à une forme totalement disponible et présentant ainsi le taux d'absorption le plus important. En théorie, la biodisponibilité relative correspond au rapport des biodisponibilités absolues pour un contaminant donné au sein de la matrice sol et pour une forme de référence *(*Kelley *et al.*, 2002 ; Casteel *et al.*, 2006 ; USEPA, 2007b). Cependant, comme précisé ci-dessus, dans les études *in vivo*, la biodisponibilité absolue des ETM dans les sols est rarement déterminée. De ce fait, pour estimer la biodisponibilité relative, l'objectif est de comparer les concentrations en ETM au sein d'un ou plusieurs compartiments cibles suite à l'exposition, par voie orale, au contaminant présent dans le sol et au sein d'une forme de référence. Dans ce cas, la mesure ne permet pas de mesurer directement la fraction biodisponible mais repose sur le principe que la concentration mesurée dans un compartiment cible donné est proportionnelle à la fraction biodisponible pour une dose d'exposition identique d'un contaminant ingéré via une forme de référence et un sol (Casteel *et al.*, 2006 ; USEPA, 2007b). La biodisponibilité relative est donc calculée comme le rapport des doses qui produisent une augmentation égale de la concentration d'un contaminant donné entre le sol et la forme de référence dans le compartiment cible utilisé. L'avantage de cette technique de mesure est qu'elle peut s'adapter au comportement toxicocinétique de chacun des ETM. Ainsi, la biodisponibilité relative peut être déterminée à partir de la mesure des concentrations dans les tissus de l'organisme ou les mesures des excrétions à différents moments de l'exposition. De ce fait, pour mesurer la biodisponibilité relative des ETM, il est important de connaître la distribution tissulaire et l'excrétion pour chacun des contaminants qui seront étudiés au cours de l'étude. En se basant sur les données présentées au sein du tableau 3, deux méthodes sont généralement utilisées :

- La mesure de la fraction de contaminant qui est excrétée dans l'urine :

De nombreux composés sont excrétés majoritairement via l'urine suite à leur absorption, et donc les analyses de l'urine peuvent fournir une indication de la dose absorbée. Basé sur les concentrations de contaminant dans les échantillons d'urine et leurs volumes, la quantité

excrétée sur une période définie peut être calculée. Cette fraction fournit une estimation de la dose absorbée pour les métaux qui sont rapidement et principalement excrétés dans les urines. La biodisponibilité relative sera par conséquent le rapport entre la quantité de contaminant excrété via l'urine pour le sol et la forme de référence. Cette méthode est généralement utilisée dans le cadre des études menées sur la biodisponibilité de l'arsenic (Freeman *et al.*, 1995 ; USEPA, 2005 ; Roberts *et al.*, 2006 ; Juhasz *et al.*, 2007). En effet, comme indiqué dans les études toxicocinétiques de l'arsenic, environ 70% de l'arsenic absorbé est excrété via l'urine 24 heures après l'exposition (ATSDR, 2007a).

- La mesure des concentrations tissulaires dans les organes accumulateurs :

Au travers cette méthode, l'intérêt est de mesurer et de comparer la concentration d'un contaminant donné dans un ou des organe(s) cible(s) suite à l'ingestion par la matrice sol et d'une forme de référence. La biodisponibilité relative sera le rapport des concentrations dans l'organe cible sélectionné du contaminant présent dans la matrice sol et au sein de la forme de référence. L'étude de la toxicocinétique des ETM montre que selon la nature des contaminants, la distribution tissulaire peut être différente. De plus, la distribution tissulaire est régie par un grand nombre de facteurs comme l'âge des individus, la spéciation des métaux ou encore les interactions entre ETM (ATSDR, 2007b, 2008). Toutefois, le foie, les reins et secondairement les os semblent être les principales cibles pour l'accumulation des ETM, tout élément confondu (Lee *et al.*, 1996). Par exemple, l'USEPA mesure les concentrations dans le foie, le rein et l'os à la fois pour la forme de référence (acétate de plomb) et 19 sols contaminés pour estimer la biodisponibilité relative du plomb (Drexler *et al.*, 2007 ; USEPA, 2007b). Pour le cadmium, le rein est généralement utilisé comme organe cible (Schroder *et al.*, 2003).

Pour résumer, la mesure de la biodisponibilité relative peut être en accord avec le comportement toxicocinétique de l'élément métallique. Par conséquent, il n'y aura pas qu'un seul compartiment cible pour mesurer la biodisponibilité relative de différents contaminants métalliques dans les sols. Pour déterminer la biodisponibilité relative du plomb, du cadmium, de l'arsenic et de l'antimoine une étude basée à la fois sur l'accumulation dans les organes cibles (foie, reins, os) et sur l'excrétion des contaminants via l'urine semble être appropriée.

III.3) Les espèces animales utilisées pour estimer la biodisponibilité pour l'homme

Les modèles *in vivo* utilisés ont pour premier objectif de représenter les caractéristiques physiologiques et anatomiques du tractus gastro-intestinal d'un enfant de 0 à 6 ans. Le tableau 3 regroupe les principaux modèles utilisés pour estimer la biodisponibilité des contaminants métalliques présents dans les sols. Ainsi, pour déterminer la biodisponibilité du plomb ou du cadmium le modèle rat, lapin et porcelet ont été utilisés (Casteel *et al.,* 1997 ; Schilderman *et al.*, 1997 ; Schroder *et al.*, 2003 ; USEPA, 2007b). Les études décrites dans la littérature montrent que la biodisponibilité de l'arsenic a été déterminée principalement via le modèle primate ou le modèle porcelet (Roberts *et al.,* 2006 ; Juhasz *et al.,* 2007). En effet, pour l'arsenic, les modèles rongeurs sont déconseillés du fait qu'une large quantité du contaminant absorbé reste liée aux cellules sanguines et qu'une faible quantité atteint les organes au contraire d'une exposition à l'arsenic chez l'homme (NEPI, 2000 ; Smith *et al.,* 2002 ; ATSDR, 2007a).

Plusieurs études indiquent que la biodisponibilité relative des ETM dans le sol va dépendre du modèle choisi (Kelley *et al.,* 2002 ; Gron, 2003 ; Juhasz *et al.,* 2003). Effectivement, chaque modèle donnera une estimation plus ou moins différente de la biodisponibilité en fonction notamment des caractéristiques du tractus gastro-intestinal (pH de l'estomac, absorption intestinale) propres à chaque modèle. En se basant sur la physiologie du tractus gastro-intestinal des rongeurs, plusieurs études confirment que ceux-ci sont nettement différents (notamment en ce qui concerne le pH de l'estomac, le temps de transit et les phénomènes d'absorption) du tractus gastro-intestinal du porcelet, du singe et de l'homme (Dressman *et al.,* 1996 ; De Zwart *et al.,* 1999). Basées sur ces difficultés à mimer le tractus gastro-intestinal humain, plusieurs études confirment que les modèles rongeurs auront tendance à sous-estimer l'absorption gastro-intestinale des contaminants (De Zwart *et al.,* 1999 ; Kelley *et al.,* 2002 ; McGeer *et al.,* 2004).

Le tableau 3 montre que ces dernières années, deux modèles sont souvent utilisés : le modèle primate (singe), notamment pour l'arsenic, et le modèle porcelet. Ceci peut s'expliquer par le fait que plusieurs études s'accordent à dire que seuls ces deux modèles ont une réalité physiologique et anatomique pour simuler le tractus gastro-intestinal de l'enfant (ISAE, 2007 ; USEPA, 2007b).

D'après la littérature, le modèle primate semble être le meilleur choix pour estimer la biodisponibilité, étant donné qu'il possède de nombreuses caractéristiques similaires à l'homme (ISAE, 2007). Toutefois, le coût des animaux, associé, à des contraintes spécifiques liées à leur manipulation rend leur utilisation limitée (Intawongse et Dean, 2006). En ce qui concerne le modèle porcelet, Davis *et al.* (2001) confirment que celui-ci est le seul modèle non primate dont les caractéristiques du transit gastro-intestinal (temps de transit, anatomie et physiologie) sont quasiment similaires à celles de l'homme. En effet, chaque section du tractus gastro-intestinal est comparable avec celles de l'Homme contrairement aux modèles rongeurs (De Zwart *et al.*, 1999 ; USEPA, 2007b). De plus, la flore bactérienne du colon et les caractéristiques de digestion de l'intestin grêle sont similaires à celles de l'homme (Dressman et Yamada, 1991 ; Rowan *et al.*, 1994). Pour ces différentes raisons, l'USEPA a développé ces dernières années une méthodologie utilisant le modèle porcelet pour déterminer la biodisponibilité du plomb dans les sols (Casteel *et al.*, 1997 ; USEPA, 2005 ; Casteel *et al.*, 2006 ; USEPA, 2007b). Depuis, le modèle porcelet a été également utilisé dans d'autres études pour estimer la biodisponibilité de l'arsenic et du cadmium (Tableau 3). Les caractéristiques qui permettent de considérer le modèle porcelet comme un modèle remarquablement similaire à l'enfant et qui permettent de l'utiliser pour estimer la biodisponibilité orale incluent (Weis *et al.*, 1991 ; Davis *et al*., 2001 ; Kelley *et al.*, 2002) :

- la taille du corps et le rapport poids/os similaires à ceux d'un jeune enfant ;
- l'anatomie et la physiologie du tractus gastro-intestinal similaire à l'enfant ;
- le métabolisme et l'excrétion des métaux similaires à ceux de l'homme (porc monogastrique omnivore) ;
- le taux de croissance ou de maturation qui est plus faible que pour les rats et les lapins ;
- l'absence de développement postnatal rapide chez le porcelet contrairement au rat. Celui-ci peut provoquer des changements dans le mécanisme de transport actif pouvant ainsi influencer l'absorption des métaux comme par exemple le plomb (Kelley *et al.*, 2002 ; ATSDR, 2007b) ;
- le porcelet est un animal très peu coprophage ;
- la possibilité d'adapter les périodes d'alimentation ce qui permet de déterminer la biodisponibilité dans un état partiellement à jeun ;
- une limite éthique et financière bien moindre que pour les primates.

Par conséquent, au travers des différentes études *in vivo* et des différents points cités ci-dessus, mis à part le modèle primate, le modèle porcelet semble être le modèle physiologiquement le plus représentatif de l'homme pour déterminer la biodisponibilité relative de plusieurs contaminants métalliques dans les sols.

III.4) Les principales études de biodisponibilité relative

En dépit de l'importance de la prise en compte de la biodisponibilité orale pour améliorer l'évaluation des risques peu d'études ont été réalisées (Roberts, 2004). Les principales raisons à cela sont que les études *in vivo* sont longues, coûteuses et posent des problèmes éthiques (Casteel *et al.*, 1997 ; McGeer *et al.*, 2004). Les principales études *in vivo* sont regroupées dans le tableau 3. Les études utilisées durant ces dernières années ont été en grande partie développées aux Etats-Unis (14 études sur 16), et notamment sous l'influence de l'USEPA (modèle porcelet) (Casteel *et al.*, 1997 ; USEPA, 2004). Ces études ont été menées pour déterminer la biodisponibilité de deux éléments métalliques, le plomb et l'arsenic, principalement sur des sites miniers et de fonderies. Le tableau 3 permet de voir que la biodisponibilité du cadmium est relativement peu étudiée et à notre connaissance aucune étude n'a encore été entreprise pour déterminer la biodisponibilité orale de l'antimoine dans les sols contaminés.

En se basant sur les études présentées au sein du tableau 3, il est possible d'identifier différents impacts de la matrice sol sur la biodisponibilité des ETM. Premièrement, les valeurs de biodisponibilité relative du plomb, de l'arsenic ou du cadmium sont très variables (de 1 à 100% pour le Pb, de 10 à 100% pour le cadmium et de 2 à 75% pour l'arsenic). Ces résultats mettent ainsi en évidence l'impact de la matrice sol sur la diminution de la biodisponibilité des éléments métalliques par rapport à une forme totalement soluble dans l'eau. En d'autres termes, ces études montrent qu'un contaminant métallique présent dans un sol donné pourra être potentiellement moins absorbé que le même contaminant présent dans une matrice totalement soluble. Ensuite, ces études indiquent que la biodisponibilité relative des ETM dans les sols est très variable entre différents sites et sources de contamination mais également pour les différents sols d'un même site. Par exemple, la biodisponibilité du plomb dans 19 sols varie de 1 à 105% (USEPA, 2007b). Ces 19 sols ont été prélevés sur 8 sites contaminés différents présentant des sources de contamination différentes. Ces résultats mettent en

évidence l'impact de la source de contamination et des phases minéralogiques du plomb sur la variation de la biodisponibilité relative entre les différents sols. De même, Juhasz *et al.* (2007b) montrent que la biodisponibilité relative de l'arsenic varie de 11 à 75% pour 6 sols d'un même site. Par conséquent, ces observations soulèvent l'importance d'étudier la biodisponibilité des ETM spécifiquement à chaque site contaminé et indiquent qu'il n'est pas envisageable de développer une valeur d'ajustement de biodisponibilité générique pour le plomb, le cadmium ou encore l'arsenic pour l'ensemble de sites contaminés.

Pour résumer, ces différentes études montrent que la prise en compte de la biodisponibilité relative pourra permettre d'affiner les calculs de dose d'exposition aux ETM suite à l'ingestion de sol (valeurs inférieures à 100%). Cependant, une limite importante pour l'utilisation en routine de la biodisponibilité en évaluation de risques est qu'elle nécessite une mesure sur l'homme ou sur un modèle animal dont la physiologie digestive est proche de celle de l'homme. En effet, même si l'avantage des modèles *in vivo* est qu'ils intègrent l'ensemble des processus pouvant affecter la biodisponibilité orale (solubilisation, absorption et métabolisation), ces études sont difficiles à mettre en œuvre, longues, coûteuses et peuvent poser des problèmes éthiques. De plus, elles nécessitent un savoir-faire expérimental de pointe. De ce fait, basé sur l'hypothèse que la bioaccessbilité est l'étape majeure dans le processus de biodisponibilité orale, plusieurs groupes de recherche ont développé des tests de digestion *in vitro* permettant d'estimer la biodisponibilité orale des contaminants du sol de manière simplifiée via la mesure de la bioaccessibilité. Ces tests ont pour objectifs d'être une alternative simple, peu coûteuse et rapide comparés aux mesures *in vivo*.

IV) Mesure de la fraction bioaccessible

IV.1) La bioaccessibilité : une étape limitante[8] de la biodisponibilité

Les résultats des études de biodisponibilité et notamment ceux obtenus par l'USEPA (2007b) montrent que la biodisponibilité est très sensible à la nature de la matrice ingérée (sol, aliments ou solution) et de la distribution du contaminant sur les phases porteuses du sol. De nombreux auteurs affirment que seule la dissolution (bioaccessibilité) est extrêmement sensible aux changements de matrice et de distribution de l'élément dans le sol (NRC, 2003 ; Gron, 2005 ; Van de Wiele, 2005 ; Oomen *et al.*, 2006). En effet, la matrice ingérée dans laquelle un contaminant est présent, c'est-à-dire, eau, nourriture ou sol, est un facteur déterminant dans la fraction de contaminant qui devient bioaccessible. La matrice pourra aussi affecter l'absorption des contaminants. Par exemple, par compétition pour les transporteurs de l'absorption ou les voies d'absorptions entre le contaminant et les composés de la nourriture. L'absorption du plomb est influencée par la présence de calcium (Mushak, 1991 ; Clarkson, 1993 ; Diamond et *al.*, 1997 ; Fullmer, 1997). Pour la majorité des composés inorganiques, la matrice n'influencera pas le métabolisme (l'effet de premier passage dans le foie) du contaminant. **Par conséquent, lors de l'application du concept de biodisponibilité, le facteur le plus important à évaluer devrait donc être le facteur de bioaccessibilité suivi du facteur d'absorption (Gron, 2003 ; Van de Wiele, 2005).** Les variations de bioaccessibilité permettront d'estimer la biodisponibilité si le processus de dissolution est limitant (c'est-à-dire si la dissolution est plus lente que l'absorption). Si le processus d'absorption est limitant (c'est-à-dire si l'absorption des contaminants dissous est trop lente pour être achevé avant le transit), c'est l'absorption qui déterminera la biodisponibilité et dans ce cas la bioaccessibilité ne permettra pas d'approcher de façon pertinente la biodisponibilité.
Actuellement la majorité des tests *in vitro* sont basés sur l'hypothèse selon laquelle l'absorption d'un composé dissous à partir d'un sol n'est pas différente de l'absorption du composé lorsqu'il est administré sous une forme relativement soluble (Oomen *et al.*, 2006 ; USEPA, 2007b). Les modèles *in vitro* partent du postulat selon lequel **le taux de solubilisation des contaminants dans les fluides digestifs est un facteur limitant et représentatif de la biodisponibilité suite à l'ingestion de ces contaminants présents dans**

[8] **Dans l'étude « étape limitante » signifie que les variations de bioaccessibilité expliquent majoritairement l'effet du sol sur la réduction de la biodisponibilité.**

la matrice sol. **Si cette hypothèse est avérée, cela signifie que, pour un sol donné, biodisponibilité et bioaccessibilité seront linéairement corrélées.**

IV.2) Les principaux tests *in vitro* de bioaccessibilité

Les tests de bioaccessibilité sont basés sur des méthodes qui, à l'origine, ont été développées dans le cadre d'études pharmaceutiques, nutritionnelles (absorption du fer), ou encore, lors d'études liées à la libération de contaminants provenant des jouets (Oomen *et al.*, 2003, Wragg et Cave, 2002 ; Wragg, 2005). Depuis la dernière décennie, de nombreux tests ont été développés dont les principaux sont regroupés dans le tableau 4. La diversité des tests *in vitro* s'explique par le fait que la majorité des équipes de recherche travaillant sur la thématique a développé indépendamment son propre test de digestion en fonction des contaminants étudiés, de l'objectif visé, ou encore de la représentativité ou non de la physiologie du tractus gastro-intestinal. Ainsi, les tests *in vitro* peuvent se différencier en plusieurs catégories détaillées ci-après.

IV.2.1) Les tests in vitro dynamiques

La solubilisation des composés du sol dans le tractus gastro-intestinal étant un processus dynamique avec des changements continuels des conditions physico-chimiques, certains laboratoires ont souhaité développer un test dynamique. Le modèle dynamique le plus cité dans la littérature est le test TIM développé par le TNO (Minekus *et al.*, 1995 ; Oomen *et al.*, 2002). A la base, ce test a été développé dans un cadre d'études pharmaceutiques et nutritionnelles afin d'estimer la biodisponibilité du fer. Proche de la réalité physiologique du tractus gastro-intestinal, il mime graduellement le transit des composés ingérés au travers du tractus digestif (Minekus *et al.*, 1995). Cependant, il est également plus complexe que les tests *in vitro* statiques et ne permet de tester qu'un seul échantillon de sol à la fois. Par conséquent, ce test a comme inconvénients d'être moins rapide et plus coûteux que des tests *in vitro* statiques. De plus, une comparaison de cinq tests de digestion *in vitro*, dont le modèle dynamique TIM, montre que des résultats similaires de bioaccessibilité sont obtenus avec certains tests *in vitro* statiques beaucoup plus simples d'utilisation (Oomen *et al.*, 2002). Par conséquent, ce test est rarement utilisé en routine pour la détermination de la bioaccessibilité des contaminants dans les sols.

Tableau 4 : Résumé des principaux tests *in vitro* de digestion permettant d'estimer la bioaccessibilité des contaminants du sol

METHODE	TYPE	Compartiment	pH	T °C	Nourriture	Ratio L/S	Temps résidence	Métaux testé	Comparaison *in vivo*	Facilité d'utilisation
PBET	Statique	Estomac Intestin grêle	2,5 7	37 37	Non Non	100/1 100/1	1 H 4H	As, Pb, Ni	porc, singe (As, Pb)	Original 3 Modifié 7
SBRC	Statique	Estomac	1,5	37	Non	100/1	1H	As, Cd, Pb	porc (Pb, As)	9
IVG	Statique	Estomac Intestin grêle	1,8 5,5	37 37	Oui Oui	150/1 150/1	1H 1H	As, Pb, Cd	porc (As, Pb, Cd)	5
US P	Statique	Estomac	1	37	Non	1000/1	2H	Pb, Cr, As, Cd, Ni		9
MB & SR	Statique	Cavité orale Estomac Intestin grêle	6,4 2 7,5	37 37 37	Non Non Non	160/1 2160/1 4770/1	5 s 2H 4H	Pb, Cr, As, Cd	humain (Pb)	3
DIN	Statique	Cavité orale Estomac Intestin grêle	6,4 2 7,5	37 37 37	Oui Oui Oui	15/1 50/1 100/1	0,5 H 2 H 6H	As, Cd, Pb, Cr, Hg	porc (Pb)	5
SHIME	Statique	Estomac Intestin grêle	5,2 6,5	37 37	Oui Oui	2,5/1 4/1	3 H 5 H	As, Cd, Pb		5
RIVM	Statique	Cavité orale Estomac Intestin grêle	6,5 1,5 5,5	37 37 37	Non Non Non	15/1 37,5/1 97,5/1	5 min 2 H 2H	As, Cd, Pb	porc (Pb, As)	6
TIM	Dynamique	Cavité orale Estomac Intestin grêle	5 2 7	37 37 37	Non Non Non	5/1 30/1 51/1	5 min 1,5 H 6 H	As, Cd, Pb, Fe		2

PBET : Physiologically Based Extraction Test
SBRC : Solubility Bioavailability Research Consortium
IVG : In Vitro Gastrointestinal
US P : US Pharmacopoeia method
MB & SR : Mass Balance Soil Recapture
DIN : (German) Deutsches Institut fur Normung
SHIME : Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem
RIVM : Rijksinstituut voor Volksgezondheld en Milieu
TIM : TNO In vitro Model

IV.2.2) Les tests statiques simplifiés ou basés sur la physiologie du tractus gastro-intestinal

La plupart des modèles présentés dans le tableau 4 sont des modèles gastro-intestinaux statiques qui simulent le transit au travers, d'une partie ou de la totalité, du tractus digestif humain par exposition successive du sol aux conditions des compartiments digestifs simulés. Précédemment, deux compartiments du tractus gastro-intestinal ont été identifiés pour avoir une grande importance dans le processus de biodisponibilité orale : l'estomac pour la solubilisation des contaminants et l'intestin grêle pour l'absorption des contaminants solubilisés. Par conséquent, les tests de bioaccessibilité sont en grande partie basés sur les caractéristiques physico-chimiques de ces deux compartiments. Pour certains auteurs, étant donné que l'absorption des composés métalliques prend principalement place dans l'intestin grêle (Mushak, 1991 ; ATSDR, 1992), la détermination de la bioaccessibilité dans le compartiment intestinal est supposée donner une valeur plus réaliste pour l'estimation de la biodisponibilité. Dans ce cas, il est donc important d'utiliser un test *in vitro* mimant la physiologie du tractus gastro-intestinal (Oomen *et al.*, 2006). Cependant, d'autres auteurs affirment qu'il est préférable d'utiliser un modèle de digestion *in vitro* comportant simplement une phase gastrique afin d'estimer rapidement la quantité maximale de contaminant bioaccessible et d'obtenir ainsi une valeur conservatoire (pénalisante) pour l'évaluation des expositions (Ruby *et al.*, 1996 ; Casteel *et al.*, 1997 ; Mercier *et al.*, 2002 ; Drexler *et al.*, 2007 ; USEPA, 2007b). Par conséquent, pour les modèles statiques, nous pouvons distinguer deux catégories de protocole :

- les tests simplifiés ;
- les tests basés sur la physiologie du tractus gastro-intestinal.

Dans le premier cas, les tests comportent simplement une phase gastrique et ne simulent qu'en partie les conditions physiologiques (particulièrement la température d'extraction et les temps de digestion). Ces tests consistent en l'extraction des contaminants du sol simplement par une solution qui simule l'environnement acide de l'estomac. Ce sont les premiers tests qui ont été

Tableau 5 : Principales études *in vitro* estimant la bioaccessibilité des ETM dans les sols

Métal	Test *In vitro*	Type et nombre de sols	Valeurs de Bioaccessibilité (%)	Référence
Pb	IVG	Jardins, sédiments, sols miniers, sols agricoles (15)	Gastro-intestinale : 2-21	Marshner et al., 2006
As	IVG	Déchets sols calcinés (5) Déchets ferreux (5)	Gastrique : 0,45-3,7 Gastro-intestinale : 0,53-3,3 Gastrique : 17,6-29,6 Gastro-intestinale : 9,5-23,5	Basta *et al.*, 2007
As	IVG	Sols agricoles et sols miniers (15)	Gastrique : 2-76 Gastro-intestinale : 3-90	Sarkar *et al.*, 2007a
As	IVG	Sols collectés à proximité des structures en bois traitées (CCA) (10)	Gastrique : 20,7-63,6 Gastro-intestinale : 25-66,3	Pouschat *et al.*, 2006
Cd	IVG	Sols miniers (5)	Gastrique : 21,3-95,9 Gastro-intestinale: 15-55	Schroder *et al.*, 2003
Pb	PBET	Sols miniers (5) Déchets miniers (5)	Gastrique : 48-75 Gastro-intestinale : 5-27 Gastrique : 15-80	Bosso *et al.*, 2007
As	PBET modifié	Sols miniers (87) Sols minéralisés (20) Fond géochimique (5) Sols fonderie (22)	Gastro-intestinale : 0,5-42,0 Gastro-intestinale : 6,8-16,7 Gastro-intestinale : 5,6-12,5 Gastro-intestinale : 0,6-61,1	Palumbo-Roe et Klinck, 2007
As	PBET	Déchets sols calcinés (5) Déchets ferreux (5)	Gastrique : 0,1-1,4 Gastro-intestinale : 0,1- 1,4 Gastrique : 12,5-40 Gastro-intestinale : 12-20	Rodriguez et Basta, 1999
As	SBRC	Sols chemins de fer (18) Site fonderie (13) Sols miniers (8) Sols fond géochimique (11)	Gastrique: 6-89 Gastrique: 9-89 Gastrique: 5-36 Gastrique : 1-22	Juhasz *et al.*, 2007a
Pb	SBRC	Sols miniers (5) Déchets miniers (5)	Gastrique : 55-80 Gastrique : 20-90	Bosso *et al.*, 2007
Pb	SBRC	Sols miniers (19)	Gastrique : 4,5-80,4	USEPA, 2004 Casteel *et al.*, 2006
Pb	RIVM	Déchets sols céramique (13)	Gastro-intestinale : 0,3-73	Oomen *et al.*, 2003a
Pb	RIVM	Sols miniers (10)	Gastrique : 3,9-70,4 Gastro-intestinale : 1,9-49,8	Oomen *et al.*, 2006
Pb	RIVM	Sols miniers fortement carbonés (4)	Gastrique : 15-56 Gastro-intestinale : 5-25	Denys et al., 2007

développés avec notamment le test SBRC pour l'estimation de la bioaccessibilité du plomb dans les sols (Ruby *et al.*, 1996, Casteel *et al.*, 1997, USEPA, 2007b).

La deuxième catégorie de tests essaye de s'approcher au mieux des mécanismes physiologiques de la digestion. C'est le cas des tests RIVM, PBET et IVG qui sont présentés dans le tableau 4. La majorité de ces tests consiste en une extraction acide qui vise à simuler les conditions de l'estomac puis une seconde extraction, proche de la neutralité, visant à simuler les conditions intestinales. En plus de ces deux phases, certains tests comportent une phase initiale qui vise à simuler le passage du sol dans la salive. Pour ces modèles *in vitro*, les processus de digestion dans le tractus gastro-intestinal sont simulés par application notamment des conditions physiologiques c'est-à-dire en essayant de respecter notamment la composition des fluides digestifs, le pH, la température et le temps de résidence caractéristique de chaque compartiment (Tableau 4). Il est cependant important de noter que la majorité de ces méthodes considère seulement l'environnement physico-chimique et ne tienne pas compte des effets des mécanismes de transport actif et du rôle des micro-organismes dans le tractus gastro-intestinal (Gron *et al.*, 2003, Wragg, 2005).

Ces dernières années de nombreuses études ont utilisé les différents tests *in vitro* pour évaluer la bioaccessibilité des contaminants (Pb, As et Cd en particulier) dans les sols (Tableau 5). Pour les modèles *in vitro* statiques, quatre méthodes sont couramment utilisées : PBET, SBRC, IVG et RIVM. Les études présentées au sein du tableau 5 mettent en évidence que la bioaccessibilité des contaminants du sol est généralement inférieure à leur concentration totale au sein de cette matrice (inférieure à 100%). De plus, ces résultats montrent que les contaminants du sol vont réagir différemment en fonction de la phase digestive simulée. En effet, la bioaccessibilité intestinale du plomb et du cadmium sera plus faible que la bioaccessibilité gastrique en raison des phénomènes de précipitation (Oomen *et al.*, 2003 ; Schroder *et al.*, 2003 ; Marshner *et al.*, 2006). Au contraire, pour l'arsenic, les valeurs de bioaccessibilité seront quasiment identiques entre les deux phases digestives (Ruby *et al.*, 1999 ; Oomen *et al.*, 2006 ; Basta *et al.*, 2007). Finalement, ces différentes études montrent que les valeurs de bioaccessibilité sont très variables intra-site et inter-sites, en fonction de la nature des sols, de la distribution des éléments métalliques sur les phases porteuses et des paramètres physico-chimiques des sols (Bosso *et al.*, 2007 ; Palumbo-Roe et Klinck, 2007 ; Sarkar *et al.*, 2007a).

Les différentes études présentées dans le tableau 5 montrent que les tests *in vitro* gastro-intestinaux présentent l'avantage de pouvoir tester un grand nombre de sols par rapport aux méthodes *in vivo*. De ce fait, ces tests pourraient être utilisés afin de réaliser un screening du site contaminé et ainsi évaluer facilement l'impact de différents paramètres sur la bioaccessibilité (Ruby *et al.*, 1999). Cependant, la difficulté est qu'en raison de la diversité des protocoles disponibles et de la variabilité dans les valeurs des paramètres caractéristiques de chacun de ces protocoles, il est évident que des différences seront observées si, pour un même échantillon de terre, la mesure de bioaccessibilité est évaluée selon des tests différents. Ceci est succinctement explicité ci-après.

IV.3) Les problèmes liés à la mesure de la bioaccessibilité

IV.3.1) Manque d'uniformité dans les paramètres des tests in vitro

A défaut de respecter plus ou moins rigoureusement la physiologie du tractus gastro-intestinal, la majorité des tests *in vitro* a été développée pour un contaminant donné et pour des conditions spécifiques engendrant ainsi une grande variation dans les valeurs des paramètres entre les tests. Ainsi, le tableau 4 montre que la température (37°C) est majoritairement le seul paramètre commun aux différents tests *in vitro* présentés. Les valeurs de pH, de ratio liquide/solide et la composition des solutions digestives diffèrent fortement d'un test à l'autre. Ainsi, dans le développement des méthodes de bioaccessibilité publiées et citées dans le tableau 4, plusieurs facteurs importants ont été identifiés comme ayant une influence dans le comportement des tests de bioaccessibilité (Oomen *et al.*, 2002 ; Morrison *et al.*, 2007 ; USEPA, 2007). Ces facteurs sont : le type d'agitation, le temps de digestion, la présence de nourriture, le pH de digestion, la taille des particules, le ratio liquide/solide, la présence d'acides organiques dans les fluides d'extraction et la quantité de bile ajoutée (Ruby *et al.*, 1996 ; Rodriguez et Basta, 1999 ; Sips *et al.*, 2001 ; Oomen *et al.*, 2002 ; USEPA, 2007b).

IV.3.2) Variation des valeurs de bioaccessibilité en fonction du test in vitro utilisé

Une étude du groupe BARGE (BioAvailability Research Group Europe) (Oomen *et al.*, 2002 ; Van de Wiele *et al.*, 2007) menée sur la comparaison des résultats de bioaccessibilité obtenus

avec cinq tests de digestion *in vitro* montre qu'en fonction du test utilisé, les résultats peuvent être significativement différents (Tableau 6). Par exemple, la bioaccessibilité dans le sol Flanders varie de 6% à 95% pour l'arsenic, de 4% à 91% pour le plomb et de 7% à 92% pour le cadmium en fonction du test utilisé. Les mêmes observations peuvent être faites pour les autres sols. De plus, les résultats montrent que les valeurs de bioaccessibilité les plus faibles sont toujours obtenues avec le test *in vitro* SHIME. Au contraire, les valeurs de bioaccessibilité les plus importantes ont été obtenues pour l'arsenic avec le test *in vitro* RIVM alors que pour le plomb et le cadmium elles ont été obtenues avec le test *in vitro* SBRC.
Ainsi, les données présentées montrent qu'en fonction du test de digestion *in vitro* utilisé, il y a une grande variabilité des données de bioaccessibilité. D'autres études mettant en œuvre des essais inter-laboratoires confirment ces résultats (Saikat *et al.*, 2007). Les principales raisons mises en avant pour expliquer ces fortes divergences entre les résultats sont principalement (Oomen *et al.*, 2002 ; Van de Wiele *et al.*, 2007) :

- les différents pH mis en jeu (notamment celui de la phase gastrique) ;
- le temps de digestion ;
- la méthode de séparation entre la fraction bioaccessible et non-bioaccessible (centrifugation, filtration, ultra-centrifugation).

De nombreux paramètres peuvent influencer la bioaccessibilité mais le pH de la phase gastrique semble être le paramètre majeur de variation (Oomen *et al.*, 2002). C'est la raison pour laquelle certains groupes de recherche ont développé des tests *in vitro* simplifiés ne comportant que la phase gastrique (Casteel *et al.*, 2006 ; USEPA, 2007b). Ainsi, en fonction du test *in vitro* utilisé, des valeurs différentes de bioaccessibilité sont obtenues et donc les données acquises par différents tests *in vitro* ne sont pas comparables entre-elles (Gron, 2005).

Tableau 6 : Valeurs de bioaccessibilité (%) (± l'écart type n = 3, sauf indication) de l'arsenic, du plomb et du cadmium après digestion *in vitro* à l'aide de six tests différents et dans trois types de sol (Oomen *et al.*, 2002).

Sols	Tests *in vitro*	Bioaccessibilité As (%)	Bioaccessibilité Cd (%)	Bioaccessiblité Pb (%)
Flanders [As] : 73 mg.kg^{-1} [Cd] : 16 mg.kg^{-1} [Pb] : 675 mg.kg^{-1}	SBRC	50 ± 0,2	**92 ± 6**	**91 ± 4**
	DIN	30 ± 1	38 ± 5	31 ± 3
	RIVM	**95 ± 10***	78 ± 9	66 ± 9
	SHIME	**6 ± 0,5**	**7 ± 1**	**4 ± 1**
	TIM	52 ± 1 (n=2)	57 ± 3 (n=2)	13 ± 3 (n=2)
Oker 11 [As] : 225 mg.kg^{-1} [Cd] : 25 mg.kg^{-1} [Pb] : 5935 mg.kg^{-1}	SBRC	11 ± 2	**92 ± 7**	**56± 4**
	DIN	11 ± 1	62 ± 16	16 ± 2
	RIVM	**19 ± 1**	51 ± 4	29 ± 2
	SHIME	**1 ± 0,02**	**5 ± 0,2**	**1 ± 0,1**
	TIM	15 ± 3 (n=2)	50 ± 11 (n=2)	4 ± 1 (n=2)
Montana 2711 [As] : 105 mg.kg^{-1} [Cd] : 41,7 mg.kg^{-1} [Pb] : 1162 mg.kg^{-1}	SBRC	59 ± 2	**99 ± 4**	**90 ± 2**
	DIN	41 ± 2	45 ± 3	46 ± 2
	RIVM	**59 ± 1**	79 ± 2	68 ± 2
	SHIME	**10 ± 0,4**	**6 ± 0,3**	**3 ± 0,3**
	TIM	50 ± 1 (n=2)	58 ± 1 (n=2)	17 ± 3 (n=2)

*En gras les valeurs extrêmes de bioaccessibilité pour chaque contaminant au sein de chaque sol

Par conséquent, avant d'utiliser un test de mesure de la bioaccessibilité en vue d'affiner le calcul d'une dose d'exposition, il est nécessaire de s'assurer de la pertinence du test mis en œuvre (Kelley *et al.*, 2002 ; Oomen *et al.*, 2006 ; USEPA, 2007b). Ces dernières années, plusieurs études ont comparé les résultats de bioaccessibilité obtenus par différents tests *in vitro* à des données de biodisponibilité relative (Rodriguez et Basta, 1999 ; Basta *et al.*, 2007 ; Drexler *et al.*, 2007 ; Jushaz *et al.*, 2007b). Cependant, selon McGeer *et al*. 2004, seule une méthode *in vitro,* le modèle SBRC, présente suffisamment de données et de critères de qualité (essai inter-laboratoires, matériaux de référence, incertitude sur la mesure) pour estimer la biodisponibilité relative et permettre ainsi une analyse quantitative des risques suite à l'ingestion de terre. Pour le moment, cette méthode est validée uniquement pour le plomb (Drexler *et al.*, USEPA, 2004 ; USPEA, 2007b). En effet, l'étude de l'USEPA (2005) montre que le test SBRC n'est pas validé pour l'arsenic.

Ainsi, cette revue bibliographique sur la bioaccessibilité *in vitro* montre qu'en dépit de l'intérêt croissant à utiliser les données *in vitro* en évaluation des risques pour affiner les doses d'exposition, il n'y a actuellement pas un test unique et corrélé à des données *in vivo* pour estimer la bioaccessibilité de plusieurs contaminants métalliques présents dans les sols. Il serait donc important de disposer d'un test *in vitro* commun et pertinent pour évaluer la bioaccessibilité de plusieurs ETM dans les sols. Ainsi, au vu des nombreux protocoles publiés et en raison des divergences des résultats, le groupe BARGE, fédération d'instituts et de laboratoires pluridisciplinaires, a souhaité développer un test de digestion *in vitro* unifié. Le but ultime est de développer un protocole unique, simple, représentatif de la réalité physiologique de l'enfant et validé afin d'estimer la biodisponibilité des ETM dans les sols par le biais de la bioaccessibilité. En effet, les différents paramètres physico-chimiques du test UBM (Unified Barge Method) sont choisis pour simuler les conditions physiologiques de digestion d'un enfant à l'état à jeun et obtenir une valeur conservatoire de bioaccessibilité. Cependant, il est nécessaire de valider ce protocole UBM par des données de biodisponibilité pour que celui-ci puisse être utilisé en évaluation de risques.

V.) Conclusion

Actuellement ne pas considérer la biodisponibilité au sein de l'évaluation de risques conduit, dans la majorité des cas, à surestimer les niveaux de risque associés à l'ingestion de terre. Il semble donc primordial de considérer ce paramètre en vue d'affiner au mieux les calculs de risque et de proposer les mesures de réhabilitation les plus optimales possibles. Pour estimer la biodisponibilité, des études *in vivo* doivent être réalisées spécifiquement à chaque site contaminé faisant l'objet d'une évaluation. Cependant, les différentes contraintes liées aux études *in vivo* représentent actuellement des limites trop importantes en vue de l'utilisation de la notion de biodisponibilité orale pour améliorer les niveaux de risques. Ainsi, ces dernières années pour approcher la notion de biodisponibilité de façon simplifiée plusieurs groupes de recherche ont essayé de développer des tests de digestion *in vitro* permettant d'estimer la quantité de contaminant solubilisée par des fluides digestifs synthétisés. Les résultats obtenus par le biais de ces nombreux tests sont très différents et ne sont pas comparables entre eux pour un sol donné.

Le constat qui s'impose, au vu de ces données, est qu'en dépit de la diversité des tests de mesure de la bioaccessibilité il y a un manque de validation des tests *in vitro* par des mesures *in vivo*. Actuellement, il n'y a pas un test unique et corrélé à des données *in vivo* pour étudier la bioaccessibilité de plusieurs contaminants présents dans la matrice sol. Ce constat conduit à deux interrogations majeures : est-ce-que la bioaccessibilité est l'étape majeure dans le processus de biodisponibilité orale et est-ce-qu'un test *in vitro* peut être validé par des mesures *in vivo* pour plusieurs contaminants ?

Ainsi, pour répondre à ces interrogations, l'objectif de la thèse était de mettre en évidence la possible utilisation du test UBM pour estimer la biodisponibilité relative de plusieurs éléments métalliques. Pour cela, l'étude a consisté à :

- disposer de sols aux caractéristiques variables (composition, historique de contamination, concentrations et distribution sur les phases porteuses) dans l'optique d'obtenir des larges gammes de valeurs de biodisponibilité et de bioaccessibilité, et ce pour les quatre éléments traces métalliques (Chapitre 2) ;

- mesurer la biodisponibilité relative des ETM à partir d'un modèle porcelet (Chapitre 3) ;

- mesurer la bioaccessibilité relative des ETM à partir du test UBM (Chapitre 4) ;

- étudier les corrélations entre bioaccessibilité relative et biodisponibilité relative et définir des critères d'acceptabilité afin de valider le test UBM (Chapitre 5).

Dans le cadre de l'étude, la biodisponibilité et la bioaccessibilité ont été étudiées pour le plomb, le cadmium, l'arsenic et l'antimoine. Le choix de ces quatre contaminants est basé sur plusieurs critères :

- Premièrement, d'après BASOL, la base de données des sites pollués du Ministère de l'Ecologie, de l'Energie, du Développement Durable et de l'Aménagement du Territoire, environ 18 % des sites pollués en France contiennent du Pb, 6 % du Cd et 13 % de l'As. L'antimoine n'est pas répertorié, cependant il est généralement retrouvé en co-contaminant du plomb et de l'arsenic. Ces éléments représentent donc des polluants « d'intérêt » pour ce qui est de la contamination des sols à l'échelle du territoire.

- Deuxièmement, l'intérêt de l'étude était d'avoir 2 métaux et 2 métalloïdes étant donné que l'étude bibliographique à mis en évidence le comportement différents de ces éléments vis-à-vis de la bioaccessibilité et de la biodisponibilité. De plus, le choix du cadmium et de l'antimoine est basé sur la méconnaissance de la biodisponibilité de ces éléments suite à l'ingestion de terre. En effet, l'étude bibliographique a montré qu'il y a une absence totale de données sur la biodisponibilité et la bioaccessibilité pour l'antimoine et très peu de données pour le cadmium.

Chapitre 2

Présentation des sites étudiés et caractérisation physico-chimique des sols échantillonnés

L'objectif de ce chapitre est de présenter les sites sur lesquels les échantillons de sols et de déchets miniers (scories) ont été prélevés puis de détailler les principales propriétés (physico-chimiques, distribution des ETM sur les phases porteuses) de l'ensemble des échantillons.

I.) Historique des sites d'étude et échantillonnage des sols

Dans le cadre de l'étude, trois sites contaminés ont été retenus. Les sites utilisés ont été sélectionnés dans l'optique d'avoir des historiques de contamination différents et des sols aux propriétés contrastées au moins en ce qui concerne la répartition des éléments métalliques au sein des phases porteuses du sol. Pour deux des sites contaminés des anomalies **géochimiques[9] se superposaient à des impacts issus d'activité d'extraction et de traitement de minerai et pour le dernier site, les sols ont été contaminés, par une fonderie de première et seconde fusion.** D'autres types de contamination auraient pu être considérés (sols contaminés par des dépôts de peintures ou par l'utilisation de pesticides). Cependant, les deux sources de contamination choisies reflétent les principaux types de contamination en France pour lesquels la démarche d'évaluation des risques est généralement mise en oeuvre.

I.1) Situations géographiques et historiques de contamination

I.1.1) Historique du site écossais de Glendinning

Le premier site (site 1) utilisé pour l'étude correspond à un site minier d'extraction d'antimoine situé à Glendinning dans le sud de l'Ecosse. L'exploitation remonte au 18ème et 19ème siècle. Vers 1788, on a essayé en Ecosse, de traiter le sulfure d'antimoine pour en obtenir le métal en y ajoutant une quantité de fer capable d'absorber le soufre. L'extraction

[9] Anomalies géochimiques : concentration naturelle en un élément chimique (ou plusieurs) dans les roches, les sols ou les sédiments, qui est très significativement supérieure aux concentrations naturelles communes pour un environnement lithologique et pédologique proche.

d'antimoine a réellement débuté en 1793 et s'est interrompue vers 1810. Ce site est également une zone fortement chargée en minerais de plomb et présentant des niveaux élevés de cuivre et d'arsenic.

I.1.2) Historique des sites du sud de la France : mines de Villemagne et du Bleymard

Le deuxième site d'étude (site 2) utilisé se compose de deux zones qui correspondent aux anciennes mines de Villemagne et du Bleymard situées respectivement dans les départements du Gard et de la Lozère. Pour les mines de Villemagne, la première concession fut attribuée en 1777 à, Monsieur de Saint-Sauveur pour l'exploitation de minerais de plomb et de cuivre. La mine fut ensuite exploitée pour le plomb, l'argent et le zinc. La concession appartient depuis 1944 à la société Penarroya, filiale de Metaleurop, qui ne l'a toutefois jamais exploitée. En ce qui concerne les anciennes mines du Bleymard, la première concession fut attribuée en 1903 à la S.A. des mines du Bleymard, pour l'extraction du plomb et du zinc. Ces deux métaux, notamment le zinc, furent extraits jusqu'en 1953, date à laquelle a eu lieu l'arrêt définitif de l'exploitation. Les minerais étaient traités dans plusieurs bâtiments dont certains sont aujourd'hui utilisés comme habitations sur le hameau du Mazel.

I.1.3) Historique du site du Nord-Pas-De-Calais : Communes avoisinantes de Noyelles-Godault

Le troisième site d'étude (site 3) se situe dans le Nord-Pas-de-Calais. Les sols de ce site ont été soumis à l'accumulation de poussières provenant d'activités industrielles implantées dans le secteur depuis plus d'une centaine d'années dont principalement l'usine MetalEurop Nord. MetalEurop, installé depuis 1894, a produit du plomb et du zinc par procédé thermique de première fusion. Les procédés thermiques utilisés pour la production de plomb et de zinc engendraient des émissions importantes de poussières et de métaux (plomb, cadmium, zinc) dans l'atmosphère qui se déposaient ensuite sur les sols environnants. Sous l'action de l'inspection des installations classées, les rejets atmosphèriques ont été réduits de manière drastique (de 350 tonnes de Pb canalisées en 1970 à une quinzaine de tonnes en 2002 auxquels il faut ajouter les rejets diffus et les envols de poussières). La société a cessé son activité au début de l'année 2003.

I.2) Echantillonnage, conservation et prétraitement des sols

Les échantillons de terre pour chaque site ont été prélevés à des profondeurs usuellement considérées pour la caractérisation de l'exposition par ingestion (0-5 cm) (BRGM, 2004c ; INERIS, 2004*)*. Les zones échantillonnées correspondaient à des lieux fréquentés par des individus et notamment des enfants. Trois types de sols ont ainsi été échantillonnés pour l'ensemble des sites contaminés : les jardins potagers des habitations voisines des anciennes sources d'exposition, les espaces potentiels de jeu (jardins et zones récréatives) et les dépôts de déchets miniers, encore appelés stériles, qui peuvent être utilisés en superficie de sentiers de promenade. Les prélèvements de sol de surface ont été effectués à l'aide d'une truelle et pour les stériles à l'aide d'une pelle. Pour chaque zone étudiée, trois à quatre échantillons de sol de volume semblable ont été prélevés en différents points de la zone d'étude. Ils ont ensuite été homogénéisés par quartage sur place, de façon à obtenir un échantillon moyen (échantillon composite) représentatif de la zone etudiée. Pour chaque site, un nombre différent de sol a été échantillonné :

- **Site 1** : **2 échantillons** représentant des déchets miniers ont été échantillonnés par le BGS[10] ;
- **Site 2** : **15 échantillons** ont été prélevés autours et sur les anciens sites miniers dans le département du Gard et de la Lozère. Ces échantillons regroupent des sols de jardins potagers et d'aires de jeux accueillant des enfants. De plus, des matériaux très concentrés correspondant à des déchets de traitement et déposés en superficie de sentiers de promenade ont également été échantillonnés.
- **Site 3 : 10 échantillons** prélevés dans les jardins potagers et aires de jeux autour de MetalEurop Nord. Une partie de ces sols a été prélevée par l'ISA[11] de Lille.

Dans la suite de l'étude, les sols des **sites miniers 1 et 2 seront annotés de 1 à 17** puis les **sols de fonderie du site 3 seront annotés de A à J**. La table 1 située en annexe 1 précise l'usage (aires de jeux, stériles ou jardin potager) de chaque sol échantillonné.

[10] British Geological Survey
[11] Institut Supérieur d'Agriculture

Après réception des échantillons au laboratoire, chaque sol a été mis à sécher en couche mince pendant 72h à température ambiante, puis homogénéisé par brassage manuel. Chaque sol a ensuite été tamisé sur un tamis de maille inférieure à 2 mm puis broyé à l'aide d'un broyeur à billes en agate pendant 20 minutes. Enfin, l'échantillon broyé est tamisé à 250 µm qui est considéré comme étant la fraction de sol adhérant aux mains des enfants (Paustenbach, 2000 ; Yamamoto *et al.*, 2006).

II.) Caractérisation physico-chimiques des sols et des associations entre les éléments d'intérêts et les phases porteuses

II.1) Détermination des concentrations en éléments métalliques dans les sols

II.1.1) Les méthodes d'extraction

En vue de déterminer les concentrations en éléments métalliques, les échantillons de terre ont été minéralisés selon les protocoles suivants :

- **Minéralisation à l'eau régale** (**NF EN 13346**) au four à micro-ondes en milieu fermé pour déterminer les concentrations en éléments métalliques qui seront utilisées pour la détermination de la **bioaccessibilité** ;

- **Minéralisation par triacide** (acide fluorhydrique, nitrique et chlorhydrique) au four à micro-ondes en milieu fermé selon la norme **NF EN 13656** afin de déterminer les concentrations en éléments métalliques qui seront utilisées pour calculer le pourcentage des éléments extraits au sein de chaque phase du processus **d'extraction séquentielle.**

II.1.2) Contrôle qualité de la minéralisation

Les acides utilisés pour l'étude sont tous de qualité ultrapure et les dilutions ont été réalisées avec de l'eau milli-Q. Chaque échantillon de terre a été minéralisé en triplicat puis analysé par spectroscopie d'émission optique couplée à un plasma induit (ICP-OES) (Jobyn-Yvon, Ultima 2).

Tableau 7 : Pourcentage de recouvrement des ETM dans les matériaux de référence (SMR 2710 et 2711) après minéralisation à l'eau régale et analyse à l'ICP-OES

	[Pb]	[Cd]	[As]	[Sb]
SMR 2710 Concentration théorique $mg.kg^{-1}$	5532	21,8	626	38,4
% recouvrement 2710 (n=5)	98,7	97,4	95,2	93,3
SMR 2711 Concentration théorique $mg.kg^{-1}$	1162	41,7	105	19,4
% recouvrement 2711 (n=5)	99,2	99,6	97,5	94,1

Tableau 8 : Concentrations en éléments traces métalliques déterminées par minéralisation à l'eau régale pour l'ensemble des sols échantillonnés sur chaque site contaminé

		[Pb] $mg.kg^{-1}$	[Cd] $mg.kg^{-1}$	[As] $mg.kg^{-1}$	[Sb] $mg.kg^{-1}$
Site 1 (n=2)	**Sol 1**	40214	24	1500	54000
	Sol 2	32598	150	25000	60000
Site 2 (n=15)	**Moyenne**	15180	74	214	189
	ET[£]	13271	45	129	239
	Min	1955	20	43	17
	Max	45664	178	461	735
Site 3 (n=10)	**Moyenne**	5090	40	64	76
	ET[£]	8910	50	73	61
	Min	1070	15	18	14
	Max	30155	183	208	182

[£]***ET : Ecart-Type des concentrations en ETM pour l'ensemble des sols d'un même site***

Les résultats présentés seront les moyennes des trois mesures. Chaque série de mise en solution comporte systématiquement deux essais à blanc pour détecter une contamination éventuelle des réactifs ou de la verrerie, et au moins un échantillon de référence certifié (SMR 2710 et SMR 2711) permettant de contrôler la qualité de la minéralisation et des analyses. Ainsi, le tableau 7 montre que les pourcentages de recouvrement obtenus pour les sols de référence (SMR 2710 et SMR 2711) sont supérieurs à 93% pour l'ensemble des contaminants et confirment ainsi le bon déroulement de la minéralisation et de l'analyse.

II.1.3) Les concentrations en éléments métalliques des sols

Les concentrations en éléments métalliques présentées pour caractériser chaque sol sont les concentrations déterminées par attaque à l'eau régale étant donné que se sont ces valeurs qui sont couramment utilisées au niveau européen et que la détermination de la bioaccessibilité sera basée sur ces données. La table 1 de l'annexe 1 détaille les concentrations en éléments métalliques pour chacun des sols.

Le tableau 8 résume les résultats en précisant les valeurs moyennes, minimales, maximales et les écarts-types pour chacun des sites contaminés et pour chaque contaminant. En résumé, les concentrations en éléments métalliques dans les sols sont très variables pour un site donné mais également d'un site à l'autre, mis à part pour le cadmium. De manière globale, les échantillons de sol présentent des concentrations en plomb nettement plus importantes que pour les trois autres contaminants. A noter tout de même que le site minier 1 est très spécifique, par ses concentrations en antimoine et en arsenic très élevées par rapport aux autres sites, ce qui est cohérent avec son historique de contamination.

II.2) Détermination des paramètres physico-chimiques des sols

Les paramètres physico-chimiques détaillés dans le chapitre I et connus pour avoir une possible influence sur la biodisponibilité et la bioaccessibilité des éléments métalliques dans les sols ont été déterminés pour l'ensemble des sols. Ainsi, en se référant aux normes, la capacité d'échange cationique (AFNOR NF X 31-130), la teneur en matières organiques (NF ISO 10694), la texture du sol permettant de définir le pourcentage d'argile, de limon et de sable (NF X 31-107), le pourcentage de calcaire total (NF ISO 10693) et le pH (NF ISO 10390

Tableau 9 : Paramètres physico-chimiques pour l'ensemble des sols échantillonnés sur chaque site contaminé

		Argiles[§] (%)	Limons[§] (%)	Sables[§] (%)	CEC[§] $cmol^{+}.kg^{-1}$	pH	MO[§] $g.kg^{-1}$	Calcaire total[§] $g.kg^{-1}$
Site 1 (n=2)	**Sol 1**	15,0	38,0	47,0	0,9	6,8	41,0	19,0
	Sol 2	18,0	43,0	39,0	1,6	7,2	56,0	31,0
Site 2 (n=15)	**Moyenne**	10,4	37,2	52,4	8,7	7,3	69,0	220,0
	ET[£]	5,9	6,8	5,5	8,5	0,7	64,0	110,0
	Min	2,8	18,7	37,8	0,6	5,7	3,2	9,6
	Max	23,0	46,5	62,7	25,0	8,1	213,0	775,0
Site 3 (n=10)	**Moyenne**	27,5	51,1	21,4	16,2	7,1	105,0	18,0
	ET[£]	3,5	4,2	3,9	7,5	0,6	27,0	17,0
	Min	23,2	42,4	15,6	1,2	5,9	58,9	1,2
	Max	34,5	61,2	25,4	22,7	7,9	145,0	59,2

£ET : Ecart-Type des valeurs obtenues pour un paramètre donné sur l'ensemble des sols d'un même site
§ montre une différence significative entre les moyennes obtenues pour chaque paramètre entre les deux historiques de contamination (minier et fonderie)

(AFNOR, 1994b)) ont été déterminés. De plus, les concentrations de certains éléments majeurs du sol (Ca, P, Fe, S, Si, Mn) ont été mesurées par ICP-OES. Les résultats de la caractérisation physico-chimique des sols sont détaillés dans les tables 2 et 3 de l'annexe 1. Le tableau 9 résume les données obtenues pour l'ensemble des sols prélevés sur les trois sites contaminés en indiquant la valeur moyenne, l'écart-type et les valeurs minimales et maximales pour chaque paramètre. De manière globale, les résultats obtenus pour le site contaminé par les dépôts atmosphériques de la fonderie sont beaucoup plus homogènes que pour les sols miniers. De plus, les résultats permettent de mettre en évidence qu'une différence significative est obtenue entre les moyennes déterminées pour chaque paramètre, mis à part le pH, en fonction de l'historique de contamination (test *U*, α =5%, $p<0,01$). Ainsi, les sols prélevés sur le site contaminé par les dépôts atmosphériques de la fonderie présentent des teneurs en argiles, en matières organiques et une capacité d'échange cationique significativement plus importantes que pour les sols miniers (sites 1 et 2). Ces résultats sont concordants étant donné que dans le sol, les particules les plus fines comme les matières organiques et les argiles ont la particularité de développer une grande surface spécifique et, de ce fait, posséder une CEC plus importante. Ainsi, les valeurs en matières organiques, argiles et la capacité d'échange cationique montrent une corrélation positive significative ($p<0,01$). Finalement, en dépit des teneurs en calcaire total significativement plus importantes pour les sols miniers, il n'y a pas de différence de pH des sols entre les deux historiques de contamination.

II.3) Estimation de la distribution des ETM par le biais d'une procédure d'extraction séquentielle

L'étude de la spéciation nécessite des outils performants et de grande sensibilité afin d'estimer les différentes formes d'un élément présentes dans un sol. L'estimation de la spéciation des ETM dans les sols est difficile à effectuer et nécessite une approche multidisciplinaire (Welter *et al.*, 1999 ; Reeder et al., 2006). Ainsi, dans le cadre de cette étude, la spéciation a été abordée par le biais de méthodes physiques (Diffraction des Rayons X, µ-LIBS, microscopie électronique) et indirectement par une procédure d'extraction séquentielle.

Les méthodes physiques utilisées présentent l'inconvénient d'avoir des limites de quantification très élevées. C'est le cas notamment de la Diffraction des Rayons X qui ne permet d'identifier que les contaminants présents sur les minéraux cristallisés et pour des concentrations supérieures à 5% massique. Ainsi, par l'utilisation des techniques physiques, des résultats de spéciation ont été essentiellement obtenus pour le plomb étant donné que c'est l'élément le plus concentré dans les sols étudiés. Pour quelques sols, des informations sur la spéciation de l'arsenic et de l'antimoine ont été obtenues par microscopie électronique mais de façon trop parcellaire pour être interprétables et extrapolables à l'ensemble des sols utilisés. De plus, les résultats obtenus par le biais de ces méthodes sont majoritairement qualitatifs (identification de phases minéralogiques auxquelles les éléments sont associés). Ainsi, pour ces différentes raisons, les résultats de spéciation obtenus par les méthodes physiques ne seront pas présentés. L'étude présentera ainsi seulement les résultats de distribution des ETM obtenus par les extractions séquentielles.

II.3.1) Principe de la technique

En raison des inconvénients liés aux méthodes physiques, la majorité des études concernant la spéciation des métaux dans les sols privilégie des techniques telles que les extractions chimiques sélectives ou séquentielles pour accéder à la répartition des éléments sur les phases porteuses (Tessier *et al.*, 1979 ; Smith *et al.*, 2008).

Le principe est basé sur le fait que l'affinité des métaux pour les constituants du sol dépend de leur configuration électronique et des conditions physico-chimiques du milieu. Ainsi, la répartition des métaux dans les sols peut être évaluée à l'aide de techniques d'extractions séquentielles, qui permettent d'extraire, de manière plus ou moins sélective, les différentes fractions solides du sol participant à la rétention des ETM, et ce, par l'utilisation d'une séquence de réactifs d'agressivité chimique croissante (Cornu et Clozel, 2000). Les éléments métalliques reliés aux fractions solides sont libérés lorsque ces dernières sont détruites. Ceci permet la détection et l'analyse de la quantité des ETM retenus par chacune des fractions solides extraites (Galvez-Cloutier et Dubé, 1998*)*. Cependant, les techniques d'extractions séquentielles sont l'objet de nombreuses critiques dans la littérature et plusieurs inconvénients de la technique sont généralement cités :

Tableau 10 : Conditions expérimentales du protocole d'extraction séquentielle

Etape	Fraction extraite	Réactif(s) utilisé(s)	Préparation du réactif	Conditions expérimentales
I	Soluble	Eau ultrapure		1 g d'échantillon + 20 ml d'eau distillée. Agitation pendant30 min
II	Echangeable	Nitrate de magnésium 1M	25,641 g $Mg(NO_3)_2$ dans 100 ml d'eau ultrapure	Résidu I + 5 ml de la solution à 1M. Agitation pendant 2 heures.
III	Acido-soluble	Acétate de sodium/ Acide acétique	8,203 g d'acétate de sodium dans une fiole de 100 ml + ajout de 10 ml d'acide acétique	Résidu II + 10 ml de solution. Agitation pendant 5 heures.
IV a	Oxydes de manganèse (Ox-Mn)	Chlorure d'hydroxylammonium	0,6949 g NH_2OH HCl dans 100 ml d'eau ultrapure	Résidu III + 10 ml de solution. Agitation pendant 30 min.
IV b	Oxydes de fer amorphes (Ox-Fe amorph)	Solution d'oxalate d'ammonium 0,2 M/ acide oxalique 0,2 M	5,6844 g $(NH_4)_2C_2O_4$ H_2O/ 5,0428 g de $H_2C_2O_4$ H_2O dans 200 ml d'eau ultrapure	Résidu IVa + 10 ml de solution. Agitation dans l'obscurité pendant 4 heures.
IV c	Oxydes de fer cristallins (Ox-Fe crist)	Solution d'oxalate d'ammonium 0,2 M/ acide oxalique 0,2 M/ acide ascorbique 0,1 M	5,6844 g $(NH_4)_2C_2O_4$ H_2O/ 5,0428 g de $H_2C_2O_4$ H_2O/ 3,5226 g de $C_6H_8O_6$ dans 200 ml d'eau ultrapure	Résidu IVb + 10 ml de solution. 30 min à 85°C.
V a	Matières organiques (MO)	Eau oxygénée 35%		Résidu IVc + 8 ml d'eau oxygénée à chaud 40-50°C pendant 30 min.
V b	Sulfures	Acide nitrique 7 N	Solution HNO_3 14N + eau ultrapure à volumes égaux	Résidu Va + 10 ml pendant 7 heures à chaud (70-80°C).
VI	Résiduelle	HF + HNO_3		Résidu Vb + 10 ml de solution. Minéralisation sur plaques chauffantes jusqu'à évaporation.

- le manque de sélectivité des extractants : les réactifs peuvent dissoudre plusieurs phases en même temps. Inversement, la solubilisation d'une certaine espèce chimique peut être incomplète, traduisant un manque d'efficacité de l'extractant ou une concentration trop importante du polluant ;

- la ré-adsorption des espèces solubilisées sur d'autres phases solides de la matrice qui entraîne une sous-estimation de la fraction recherchée ;

- la diversité des protocoles rend difficile l'intercomparaison entre les études existantes (Cornu et Clozel, 2000).

En dépit de ces critiques, les extractions chimiques sont très utilisées car elles permettent d'avoir rapidement une idée globale qualitative et quantitative sur l'association des ETM avec les différentes phases de la matrice. De plus, cette méthode permet, contrairement aux méthodes physiques, d'atteindre des limites de détection très faibles pour certains éléments et par conséquent d'obtenir une information sur la spéciation pour les sols faiblement contaminés (de l'ordre de 1 µg/l en solution). La spéciation des métaux par des extractions séquentielles n'est cependant pas suffisante et doit être utilisée avec beaucoup de précaution dans certains cas.

II.3.2) Protocole d'extraction

De nombreux protocoles d'extractions séquentielles ont été proposés depuis une vingtaine d'années et généralement le plus utilisé par la communauté scientifique est celui développé par Tessier *et al.* (1979). Cependant, dans de cadre de l'étude, un protocole développé par Leleyter et Probst (1999) a été utilisé étant donné que ce dernier permet de détailler la phase oxydante en « distinguant » les oxydes de manganèse, les oxydes de fer amorphes et les oxydes de fer cristallins. Ainsi, il se déroule en neuf étapes et les conditions expérimentales sont regroupées dans le tableau 10. Entre chaque phase, la solution est centrifugée afin de séparer le surnageant du résidu. Le résidu de sol est lavé deux fois avec 10 ml d'eau milli-Q puis mis à sécher à 37°C pour 24 heures minimum avant de subir l'étape suivante.

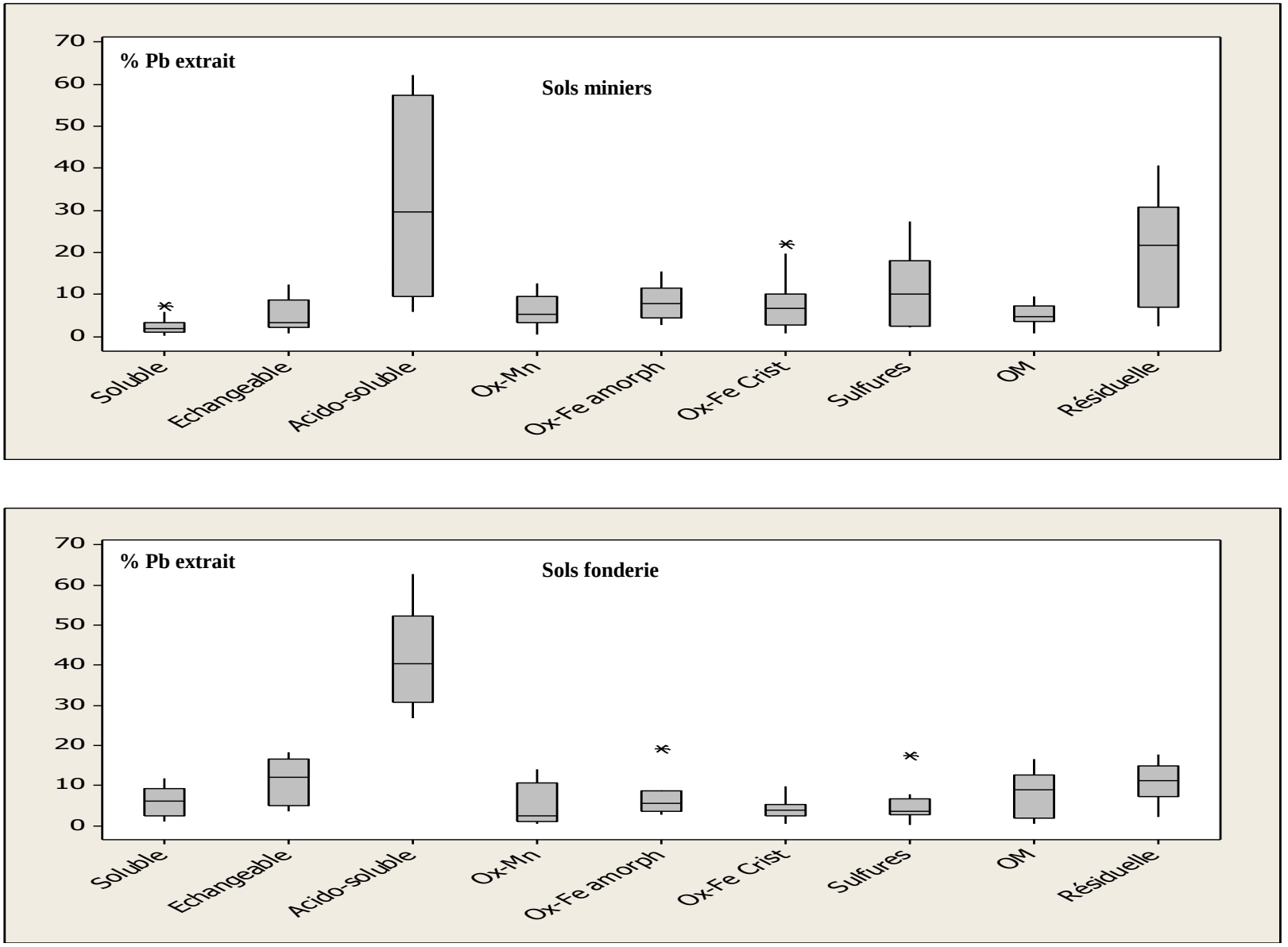


Figure 6 : Pourcentage de plomb extrait dans chaque phase d'extraction séquentielle dans les sols issus de deux historiques de contamination différents

II.3.3) Contrôle qualité de la procédure d'extraction séquentielle

Toutes les extractions sont réalisées en triplicat et incluent un blanc de réactifs et des matériaux de référence (SMR 2710 et SMR 2711). Les matériaux de référence permettront de définir le taux de recouvrement pour chacun des contaminants. Les résultats présentés sont la moyenne des trois réplicats. Les solutions sont analysées soit en ICP-OES (analyse par spectrométrie d'émission optique couplée à un plasma induit) ou en ICP-MS (analyse par spectrométrie de masse couplée à un plasma induit) en fonction de la concentration des éléments dans chacune des phases. Le pourcentage de recouvrement des ETM pour chaque matériau de référence utilisé est supérieur à 97%. Ces résultats permettent d'affirmer que la procédure d'extraction séquentielle et que les analyses se sont correctement déroulées.

II.3.4) Distribution des ETM sur les phases porteuses

Pour la suite de l'étude, les sols des sites 1 et 2, qui ont une source de contamination similaire, seront regroupés afin de mettre en évidence une différence de distribution des ETM dans les sols entre les deux sources de contamination : minière et fonderie.
Les extractions séquentielles ont permis de mettre en évidence la distribution de chaque élément trace au sein des 27 sols étudiés. Les tables 1 à 4 de l'annexe 2 présentent l'ensemble des résultats obtenus par les extractions séquentielles. Les résultats présentés ci-dessous, montreront sous forme de « boîtes à moustache » la distribution moyenne de chaque élément trace au sein des 17 sols miniers puis des 10 sols contaminés par les dépôts atmosphériques de la fonderie.

- *Le plomb*

La figure 6 présente la distribution moyenne du plomb dans les échantillons de sol issus de deux sources de contamination différentes. Premièrement, le pourcentage de recouvrement du plomb déterminé dans les neuf phases de l'extraction pour l'ensemble des sols varie de 88% à 104%. Pour les deux sources de contamination, le plomb est principalement extrait de la phase acido-soluble. En moyenne, le plomb est présent dans cette phase à 32% pour les sites

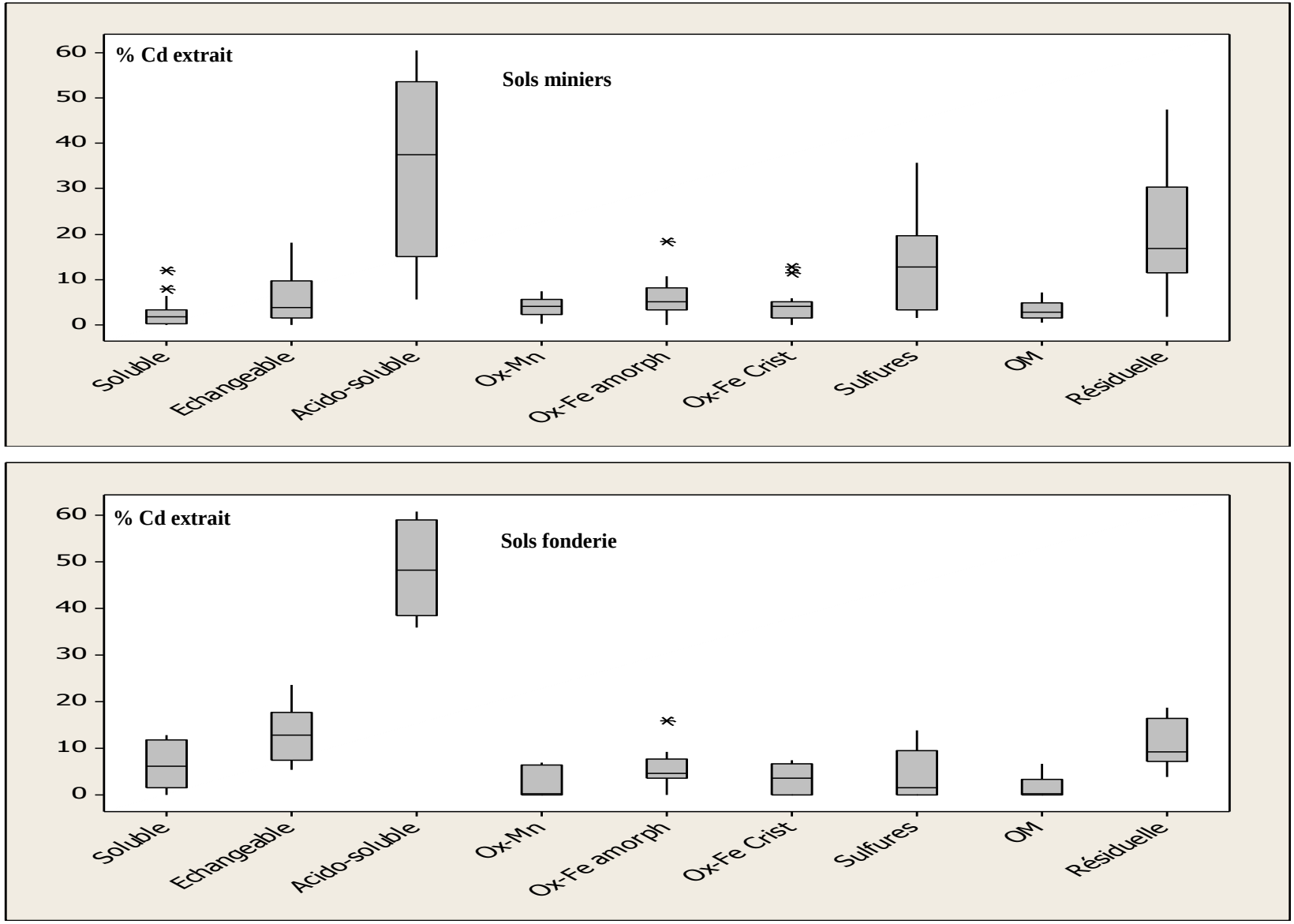


Figure 7 : Pourcentage de cadmium extrait dans chaque phase d'extraction séquentielle dans les sols issus de deux historiques de contamination différents

miniers et 44% pour le site contaminé par la fonderie. Ces résultats sont en cohérence avec ceux obtenus par Denys *et al.* (2007*)*. En effet, pour le même schéma d'extraction et pour des sols échantillonnés sur un autre site minier, le plomb était majoritairement présent dans la phase acido-soluble. Ensuite, il y a une distribution plus ou moins importante dans les autres phases en fonction de l'historique de contamination. Des différences significatives dans la distribution du plomb dans les fractions soluble, acido-soluble, sulfure et résiduelle sont obtenues (test *U*, α =5%, $p<0,05$). Les résultats montrent que les pourcentages de plomb extrait dans la fraction soluble (7,5%) et dans la fraction acido-soluble (44%) étaient significativement plus importants pour le site contaminé par les dépôts atmosphériques de la fonderie par rapport aux sols des sites miniers (3% et 32%, respectivement) ($p<0,05$). Au contraire, le plomb est significativement plus concentré dans les phases associées aux sulfures (12,5%) et dans la fraction résiduelle (19,6%) pour les sols contaminés par les anciennes activités minières par rapport aux sols prélevés à proximité de la fonderie (4,8% et 7,9%, respectivement) ($p<0,051$).

- *Le cadmium*

La figure 7 présente le pourcentage de cadmium extrait dans chaque phase d'extraction séquentielle dans les sols. Le pourcentage de recouvrement du cadmium pour l'ensemble des sols varie de 85% à 102%. De nombreuses études confirment que le plomb et le cadmium ont un comportement similaire en terme de mobilité dans les sols (Alloway, 1995 ; Mcbride, 1997). En effet, comme pour le plomb, le cadmium est principalement extrait de la fraction acido-soluble pour les deux sources de contamination. En moyenne, le cadmium est présent dans cette phase à 36% pour les sols miniers et 49% pour les sols contaminés par la fonderie. Cependant, la distribution dans cette phase pour les sols miniers est beaucoup plus variable. Ensuite, des différences significatives dans la distribution du cadmium dans les fractions soluble, échangeable, acido-soluble, sulfure et résiduelle sont obtenues (test *U*, α =5%, $p<0,05$).

Les résultats montrent que les pourcentages de cadmium extrait dans la fraction soluble (6,5%), échangeable (13,5%) et dans la phase acido-soluble (49%) étaient significativement plus importants pour le site contaminé par les dépôts atmosphériques de la fonderie comparativement aux sols des sites miniers (2,8%, 6% et 36%, respectivement) ($p<0,05$). Au contraire, le cadmium est plus concentré dans les phases associées aux sulfures (13,5%) et dans la fraction résiduelle (20,5%) pour les sols contaminés par les anciennes activités

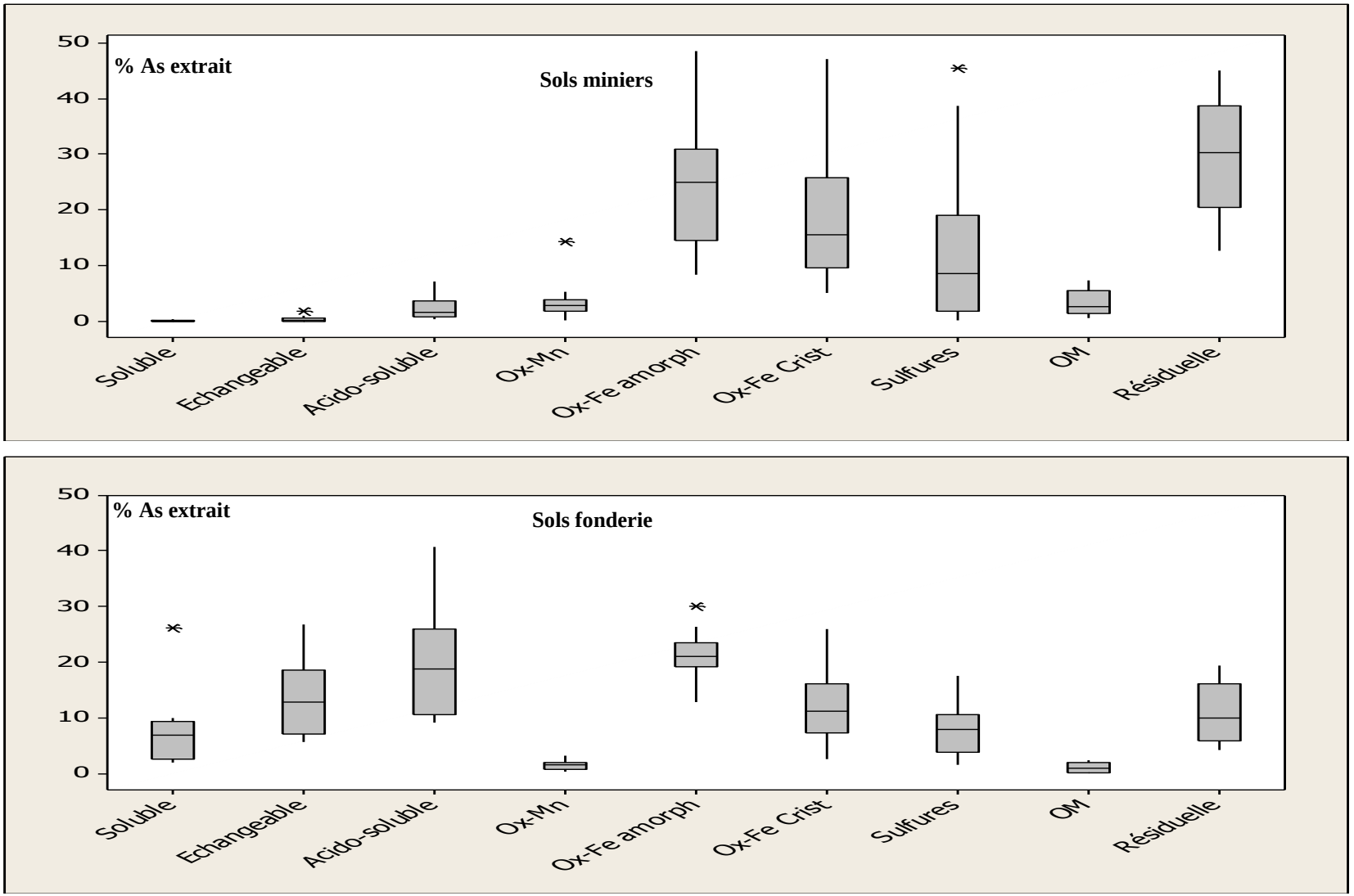


Figure 8 : Pourcentage d'arsenic extrait dans chaque phase d'extraction séquentielle dans les sols issus de deux historiques de contamination différents

minières par rapport aux sols prélevés à proximité de la fonderie (4,6% et 10,8%, respectivement) ($p<0,05$).

- *L'arsenic*

La distribution moyenne de l'arsenic dans chaque phase d'extraction séquentielle dans les sols issus des deux sources de contamination différentes est présentée sur la figure 8. Premièrement, le pourcentage de recouvrement d'arsenic déterminé dans les neuf phases de l'extraction séquentielle varie de 87% à 105%. Les résultats montrent qu'il y a une distribution très différente de l'arsenic en fonction de l'historique de contamination. En effet, pour les sols contaminés par les activités minières, l'arsenic est principalement présent dans les phases oxydes de fer (amorphes et cristallisés), sulfures et résiduelle. Ces résultats confirment ceux obtenus par Gal *et al.* (2006) qui montrent par le biais d'extraction séquentielle et d'extraction CISED (Chemometric Identification of Substrates and Element Distribution) (Cave *et al.*, 2004) que l'arsenic est fortement lié aux oxy-hydroxydes de fer et aux composés de la fraction résiduelle pour des sols échantillonnés sur le site minier de Glendinning.

Pour les sols contaminés par les dépôts atmosphériques de la fonderie l'arsenic est toujours principalement lié au fer mais également présent dans les phases soluble, échangeable et acido-soluble. Le test *U* de Mann-Whitney a permis de mettre en évidence des différences significatives dans la distribution de l'arsenic entre les deux historiques de contamination au sein des fractions soluble, échangeable, acido-soluble, sulfure et résiduelle. En effet, les résultats montrent que les pourcentages d'arsenic extrait dans la phase soluble (7,9%), échangeable (13,7%) et dans la phase acido-soluble (20,7%) étaient significativement plus importants pour le site contaminé par les dépôts atmosphériques de la fonderie comparativement aux sols des sites miniers (0,08%, 0,4% et 2,5%, respectivement).

- *L'antimoine*

La distribution moyenne de l'antimoine au sein de chaque phase de l'extraction séquentielle est montrée sur la figure 9. Le pourcentage de recouvrement de l'antimoine, déterminé dans les neuf phases de l'extraction séquentielle, varie de 91% à 101%. Contrairement aux trois autres ETM, il y a une distribution relativement similaire et plus homogène de l'antimoine

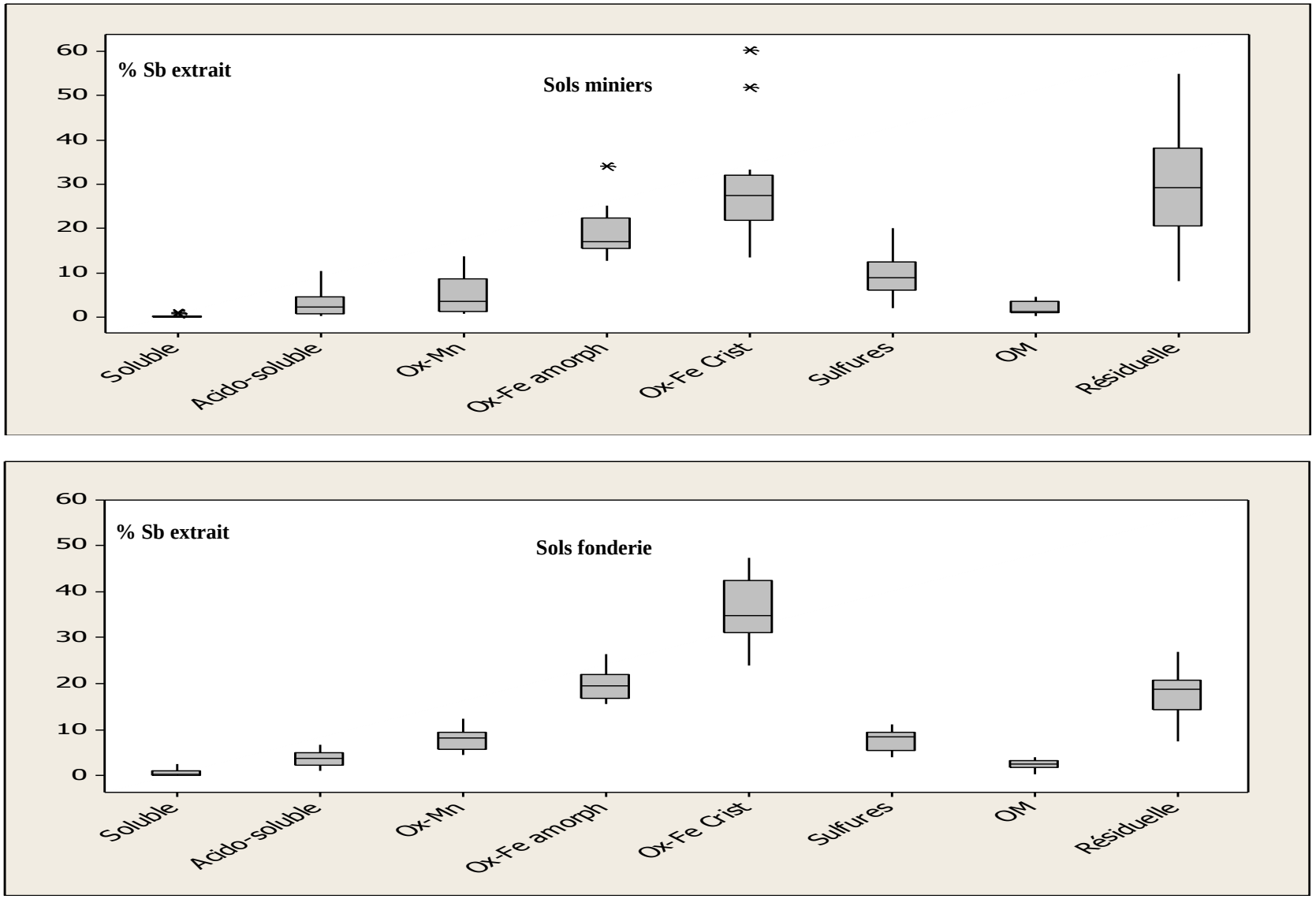


Figure 9 : Pourcentage d'antimoine extrait dans chaque phase d'extraction séquentielle dans les sols issus de deux historiques de contamination différents

en fonction de l'historique de contamination. En effet, pour l'ensemble des sols contaminés, l'antimoine est principalement lié aux oxydes de fer. Ces résultats confirment ceux de Gal *et al.* (2006) qui montrent que l'antimoine est fortement lié aux oxy-hydroxydes de fer et à la phase résiduelle pour des sols échantillonnés sur le site minier de Glendinning. De plus, l'ensemble des études portant sur la distribution et la mobilité de l'antimoine dans les sols montre que le fer est le principal composé adsorbant pour l'antimoine. Par exemple, Jonhson *et al.* (2005), à l'aide d'extractions séquentielles du sol, montrent que plus de 90% de l'antimoine extrait était lié aux oxydes de fer cristallins et amorphes. Les résultats du test de Mann-Whitney montrent qu'il y a une différence significative entre les deux historiques de contamination seulement pour la phase résiduelle. En effet, les sols des sites miniers présentent des concentrations en antimoine dans la phase résiduelle plus importantes (29,6%) que pour les sols du site 3 (17,9%).

III.) Conclusion

La caractérisation des 27 sols présentant deux sources de contamination différentes (minière et fonderie) a permis de comparer leurs principales caractéristiques physico-chimiques et de mettre en évidence leurs niveaux de contamination par le plomb, le cadmium, l'arsenic et l'antimoine. Les fortes teneurs en polluants observées et surtout leurs concentrations différentes en fonction de l'échantillon, peuvent être expliquées par la configuration des sites de prélèvement sélectionnés. De plus, les résultats montrent qu'il y a des différences significatives des caractéristiques physico-chimiques des sols, qui se répercuteront sur la distribution des ETM dans les sols. En effet, les résultats des extractions séquentielles, montrent que le plomb, le cadmium et l'arsenic se distribuent différemment sur les différentes phases porteuses en fonction de l'historique de contamination. Ainsi, les sols contaminés par les dépôts atmosphériques de la fonderie présentent des formes de plomb, de cadmium et d'arsenic plus mobiles et extractibles que les sols échantillonnés sur les sites miniers. Pour l'antimoine, les résultats montrent que ce contaminant est présent pour l'ensemble des sols dans des phases très peu extractibles (oxy-hydroxydes de fer, sulfures, fraction résiduelle) indépendamment de l'historique de contamination. Pour conclure, les sols étudiés répondent à notre attente qui était d'obtenir des sols présentant des caractéristiques physico-chimiques et des distributions des ETM sur les phases porteuses contrastées, pouvant influer sur la biodisponibilité et sur la bioaccessibilité.

Chapitre 3

Développement d'une méthode *in vivo* pour déterminer la biodisponibilité relative du plomb, du cadmium, de l'arsenic et de l'antimoine dans les sols

---

L'objectif était de développer et d'appliquer une méthode d'estimation de la biodisponibilité relative pertinente pour les quatre éléments traces métalliques retenus. Ces valeurs *in vivo* seront ensuite comparées à des valeurs de bioaccessibilité *in vitro* afin de valider ces dernières. Dans un premier temps, le modèle *in vivo* (porcelet) et la procédure mise en place pour estimer la biodisponibilité relative des contaminants métalliques dans les sols seront décrits. Puis, les résultats de biodisponibilité relative obtenus pour chacun des contaminants au sein des sols retenus seront présentés et discutés.

I.) Matériels et méthodes

I.1) Sélection des sols étudiés

Dans l'objectif d'obtenir potentiellement une corrélation robuste entre les données de bioaccessibilité *in vitro* et les valeurs de biodisponibilité relative *in vivo*, il est important d'avoir pour chaque contaminant, une variation de la gamme de biodisponibilité relative la plus large possible ainsi que des valeurs réparties régulièrement tout le long de cette gamme. Dans le but d'obtenir ces conditions, suite à la caractérisation physico-chimique des échantillons, 15 sols ont été retenus pour estimer la biodisponibilité relative du plomb, du cadmium, de l'arsenic et de l'antimoine. La sélection de ces sols est fondée sur plusieurs critères :

- les deux historiques de contamination (minier et fonderie) doivent être représentés étant donné que la biodisponibilité des contaminants métalliques peut être influencée par l'historique de contamination ;

Tableau 11 : Caractéristiques physico-chimiques des 15 sols sélectionnés pour l'étude de la biodisponibilité relative

Site	Sol	Nature des sols	[Pb] $mg.kg^{-1}$	[Cd] $mg.kg^{-1}$	[As] $mg.kg^{-1}$	[Sb] $mg.kg^{-1}$	Argiles (%)	Matière Organique $g.kg^{-1}$	Calcaire Total $g.kg^{-1}$	CEC $cmol^{+}.kg^{-1}$	pH
Site 1 (minier)	1	Stériles	40214	24	1500	54000	18,0	56,0	19,0	0,89	6,8
	2	Stériles	32598	150	25000	60000	15,0	41,0	31,0	1,56	7,2
Site 2 (minier)	4	Stériles	11665	106	105	19	14,7	13,0	159,0	25,0	7,9
	5	Stériles	11264	35	390	708	3,3	4,01	98,9	1,05	7,4
	7	Jardin Potager	4482	69	43	21	5,1	3,15	775,0	0,6	7,9
	10	Jardin	6791	144	247	99	11,4	76,5	203,0	10,8	7,75
	14	Jardin	19291	90	214	98	7,4	57,5	156,0	7,96	6,9
	15	Aire de jeux	37532	178	297	144	9,2	80,3	35,0	4,35	6,7
	16	Aire de jeux	32833	81	283	119	2,8	4,22	138,0	0,66	8,1
Site 3 (fonderie)	A	Sentier Pédestre	30155	22	21	84	24,6	112,5	5,1	4,2	6,6
	C	Jardin	5590	30	61	175	30,1	120,7	33,2	18,6	7,9
	D	Aire de jeux	3710	24	24	91	23,2	136,0	32,7	22,0	7,2
	F	Jardin	1460	30	18	30	25,1	82,0	2,8	22,0	6,9
	G	Jardin	1830	20	20	18	31,2	58,9	21,9	21,7	7,6
	H	Jardin Potager	1630	184	190	72	28,8	72,5	7,7	22,5	7,0

- les sols sélectionnés doivent présenter des caractéristiques physico-chimiques et une distribution sur les phases porteuses contrastées ;

- les sols sélectionnés doivent disposer de concentrations en ETM suffisamment importantes afin de pouvoir quantifier la présence des contaminants dans les organes cibles après exposition aux sols par voie orale.

En essayant de respecter, pour chacun des contaminants, l'ensemble de ces critères les 15 sols sélectionnés sont les suivants: 1, 2, 4, 5, 7, 10, 14, 15, 16, A, C, D, F, G et H. Les principales caractéristiques physico-chimiques de ces 15 sols sont présentées au sein du tableau 11. Le choix des sols est basé également sur les résultats des extractions séquentielles présentés précédemment et détaillés au sein de l'annexe 2 (Tables 1 à 4). En plus de ces 15 sols, le sol de référence SMR 2710 a été sélectionné car aucune donnée de biodisponibilité n'est disponible dans la littérature alors qu'il est couramment utilisé comme sol de référence dans les tests de bioaccessibilité.

I.2) Le modèle porcelet

Suite à l'étude bibliographique, le modèle porcelet a été retenu. Les porcelets utilisés dans cette étude sont des mâles castrés issus d'un croissement terminal Piétrain x (Large White x Landrace) dont le poids au sevrage (28 jours), lors de leur arrivée, était compris entre 7 et 9 kg.

I.3) Calcul de la biodisponibilité relative

L'objectif de la biodisponibilité relative est de comparer l'accumulation ou l'excrétion d'un contaminant ingéré via la matrice sol et via une forme de référence. La détermination de la biodisponibilité relative sera estimée à partir de l'hypothèse que des doses d'exposition identiques d'un contaminant ingéré, via une matrice de référence et un sol contaminé, devraient produire une augmentation similaire de la concentration du contaminant dans un compartiment cible donné (Casteel *et al.*, 2006 ; USEPA, 2007b). Par conséquent, la biodisponibilité relative est calculée comme le ratio des doses qui produisent une augmentation égale pour les concentrations d'un contaminant donné entre le sol et la forme de référence. Cette approche est basée sur l'hypothèse que la concentration d'un composé dans

un tissu est directement proportionnelle à la fraction biodisponible. Pour cela, la détermination de la biodisponibilité relative doit se faire dans le domaine linéaire de la courbe dose-réponse obtenue (Littel *et al.*, 1997). Si, des réponses linéaires sont obtenues, la biodisponibilité relative est le ratio entre les pentes des courbes dose-réponse pour le sol contaminé et la forme de référence (Equation 3)

$$\text{Biodisponibilité relative (\%)} = \frac{\text{Pente de la courbe dose-réponse obtenue pour la matrice sol}}{\text{Pente de la courbe dose-réponse obtenue pour la forme de référence}} * 100$$

Équation 3 : Détermination de la biodisponibilité relative

Pour appliquer cette méthode de calcul, il est important de respecter plusieurs conditions :

- le modèle dose-réponse utilisé pour ajuster les données doit être identique pour la forme de référence et pour la matrice sol et la détermination de la biodisponibilité relative se fait dans la partie linéaire du modèle ;
- toutes les courbes dose-réponse obtenues pour le même contaminant et pour le même compartiment cible doivent avoir des valeurs d'ordonnée à l'origine non significativement différentes de la valeur obtenue pour un porcelet témoin non exposé. Cette étape permet de vérifier que pour une dose d'exposition nulle, les concentrations en ETM, pour un compartiment cible donné, sont comparables entre un porcelet exposé aux contaminants du sol et un porcelet non exposé.

I.4) Les formes de référence et les compartiments cibles utilisés

I.4.1) Les formes de référence

Les formes de référence doivent être les plus solubles (bioaccessible) possibles. Ainsi, en se référant aux études de biodisponibilité *in vivo* publiées et regroupées dans le tableau 3 du premier chapitre, les formes de référence utilisées pour estimer la biodisponibilité relative du plomb, du cadmium et de l'arsenic seront : l'acétate de plomb, le chlorure de cadmium, l'arséniate de sodium. Comme indiqué dans le tableau 3, aucune étude *in vivo* n'a eu pour objectif de déterminer la biodisponibilité relative de l'antimoine dans les sols. La particularité de ce contaminant est qu'il a été principalement observé sous la forme pentavalente dans les sols (Takaoka *et al.*, 2005 ; Scheinost *et al.*, 2006 ; Denys *et al.*, 2008) alors que la majorité

des études publiées dans la littérature portent sur la toxicité et la distribution de l'antimoine trivalent dans les tissus étant donné que c'est la forme la plus toxique pour les organismes vivants (ATSRD, 1992). Or, il est reconnu que la distribution et les voies d'excrétion seront différentes en fonction de la spéciation de l'antimoine (Dieter *et al.*, 1991 ; ATSDR, 1992). De ce fait, le peu de données sur l'absorption de l'antimoine V apparaît comme une limite pour choisir une forme de référence et les organes cibles afin d'évaluer la biodisponibilité relative de l'antimoine dans les sols. L'étude du comportement toxicocinétique (absorption, distribution et excrétion) d'une forme soluble d'antimoine V par voie orale nous est apparue nécessaire pour une bonne évaluation de la biodisponibilité relative de l'antimoine dans les sols. Une étude préliminaire a donc été entreprise afin de mesurer l'accumulation ou l'excrétion de l'antimoine dans différents organes et fluides (foie, reins, os, rate, sang, plasma, urine, bile et poils) chez le porcelet exposé par voie orale à un sel soluble d'antimoine V. La forme d'antimoine V utilisée était l'antimoniate de potassium ($KSb(OH)_6$) en raison de sa grande solubilité dans l'eau et de sa faible toxicité (May *et al.*, 2006). Sur la base de ces résultats, l'antimoniate de potassium est la forme de référence retenue pour déterminer la biodisponibilité relative de l'antimoine dans les sols (Caboche *et al.*, 2009).

I.4.2) Les compartiments cibles

Pour l'antimoine, au travers de l'étude réalisée sur l'antimoniate de potassium, nous avons confirmé premièrement qu'en fonction de l'état de valence de l'antimoine la distribution de celui-ci sera différente, avec notamment une excrétion urinaire plus importante pour l'antimoine V. Ensuite, les résultats montrent qu'en fonction de la concentration et de la bioaccessibilité de l'antimoine dans les sols, plusieurs compartiments pourront être utilisés pour estimer la biodisponibilité relative. Dans la gamme utilisée dans cette étude (200 à 1600 µgSb/kgPV/jour), les reins, le foie, la rate et l'urine sont des indicateurs satisfaisants pour déterminer la biodisponibilité. Cependant, pour les sols faiblement contaminés en antimoine, ce qui est le cas pour la majeure partie des sols qui sont utilisés pour l'estimation de la biodisponibilité relative, l'urine sera probablement le compartiment le plus approprié du fait de sa sensibilité plus importante par rapport aux organes cibles.

Pour les autres contaminants (Pb, Cd et As), en se basant sur les données toxicocinétiques issues de la littérature (ATSDR, 2007a , 2007b, 2008) et sur les données regroupées dans le tableau 3 du chapitre 1 : le foie, les reins, l'os et l'urine pourront être utilisés comme compartiments cibles en fonction d'un contaminant donné. Pour l'os, le métacarpe IV a été

Tableau 12: Quantités de contaminants (µg) ingérés par jour pour les 15 sols contaminés suite à l'ingestion de 0,5g ; 1g et 2g de sol

Sol	Ingestion 0,5 g de sol µg Pb ingéré/jour	Ingestion 1 g de sol µg Pb ingéré/jour	Ingestion 2 g de sol µg Pb ingéré/jour
1	20107	40214	80248
2	16299	32598	65196
4	5833	11665	23330
5	5632	11264	22528
7	2241	4482	8964
10	3396	6791	13582
14	9646	19291	38582
15	18766	37532	75064
16	16416	32833	65666
A	15077	30155	60309
C	2795	5590	11780
D	1855	3710	7420
F	731	1460	2925
G	915	1830	3660
H	815	1630	3260
SMR 2710	2766	5532	11064

Sol	Ingestion 0,5 g de sol µg As ingéré/jour	Ingestion 1 g de sol µg As ingéré/jour	Ingestion 2 g de sol µg As ingéré/jour
1	750	1500	3000
2	12500	25000	50000
4	52,5	105	210
5	195	390	780
7	21,5	43	86
10	123,5	247	494
14	107	214	428
15	148,5	297	594
16	141,5	283	566
A	10,5	21	42
C	30,5	61	122
D	12	24	48
F	9	18	36
G	10	20	40
H	95	190	380
SMR 2710	313	626	1252

Sol	Ingestion 0,5 g de sol µg Cd ingéré/jour	Ingestion 1 g de sol µg Cd ingéré/jour	Ingestion 2 g de sol µg Cd ingéré/jour
1	12	24	48
2	75	150	300
4	53	106	212
5	17,5	35	70
7	34,5	69	138
10	72	144	288
14	45	90	180
15	89	178	356
16	40,5	81	162
A	11	22	44
C	15	30	60
D	12	24	48
F	15	30	60
G	10	20	40
H	92	184	368
SMR 2710	11	22	44

Sol	Ingestion 0,5 g de sol µg Sb ingéré/jour	Ingestion 1 g de sol µg Sb ingéré/jour	Ingestion 2 g de sol µg Sb ingéré/jour
1	27000	54000	108000
2	30000	60000	120000
4	9,5	19	38
5	354	708	1416
7	10,5	21	42
10	49,5	99	198
14	49	98	196
15	72	144	288
16	59,5	119	238
A	42	84	168
C	87,5	175	350
D	45,5	91	182
F	15	30	60
G	9	18	36
H	36	72	144
SMR 2710	19,5	39	78

choisi, en raison des facilités de prélèvement, pour étudier l'accumulation des contaminants et non le fémur généralement utilisé dans les études de biodisponibilité menées par l'USEPA (Casteel *et al.*, 1997, 2006 ; USEPA, 2007b).

I.5) Les doses d'exposition

L'objectif de cette étude était de déterminer la biodisponibilité relative des quatre contaminants dans les 15 sols durant la même expérience *in vivo*. La difficulté, comme le montre le tableau 11, était que les concentrations des contaminants dans les sols sont très variables pour le même élément trace métallique mais également entre contaminants. De manière globale, les sols présentent des concentrations en plomb nettement plus importantes que celles des trois autres contaminants. De ce fait, la difficulté était de définir une gamme de doses d'exposition permettant d'observer des réponses biologiques pour chaque sol et chaque contaminant. Pour définir les doses d'exposition, deux démarches peuvent être utilisées :

- Soit pour l'ensemble des contaminants et des sols, les doses d'exposition sont définies. Puis, en fonction des concentrations totales en contaminant de chaque sol, la quantité de sol ingéré est calculée. Cette démarche est notamment utilisée dans les études de l'USEPA dans le cadre de la détermination de la biodisponibilité relative du plomb ou de l'arsenic (USEPA, 2005, 2007b). Cependant, cette démarche est facilement utilisable lorsque l'étude porte sur un seul contaminant ou lorsque les contaminants présentent des concentrations totales très proches dans les sols. L'inconvénient est que cette méthode engendre des quantités de sol ingéré variables en fonction des concentrations en contaminant dans les sols ce qui peut influencer la biodisponibilité des ETM.

- Soit pour l'ensemble des contaminants et des sols, des quantités de sol à ingérer sont définies. Puis, en fonction des concentrations totales en contaminant, les doses d'exposition sont calculées. Cette démarche entraîne par conséquent des doses d'exposition variables pour chaque sol et chaque contaminant. La difficulté, dans ce cas, est de définir convenablement les quantités de sol à ingérer afin d'obtenir des

doses d'exposition suffisantes pour quantifier la biodisponibilité relative de chaque contaminant dans le plus grand nombre de sol.

Dans l'objectif de déterminer la biodisponibilité des quatre ETM dans les sols et en raison des fortes différences de concentration entre les contaminants, il n'a pas été possible de travailler directement en dose d'exposition fixe. En effet, cela aurait engendré, entre autre, des variations de quantités de sol ingéré beaucoup trop importantes. Dans le cadre de l'étude, l'objectif a été de définir trois quantités de sol. La difficulté pour le choix de ces quantités était de trouver un compromis entre :

- définir des quantités de sol à ingérer assez importantes afin de s'affranchir des limites et contraintes analytiques. Dans ce cas, le choix des quantités de sol a été basé sur les contaminants les moins concentrés, c'est-à-dire le cadmium et l'antimoine ;

- respecter des valeurs représentatives des valeurs d'ingestion de terre pouvant se présenter chez un enfant et ainsi éviter d'avoir des quantités de sol à ingérer extrêmes pouvant impacter la biodisponibilité et rendant difficile la prise de la dose d'exposition par le porcelet ;

- définir des doses d'exposition permettant de rester dans le domaine linéaire des courbes dose-réponse.

Dans le cadre de l'étude, **trois quantités de sol ingéré ont été déterminées : 0,5g, 1g et 2g.** En se basant sur les concentrations totales, la quantité de contaminant ingéré par jour pour chaque sol et chaque dose a été calculée. Ces valeurs sont présentées dans le tableau 12. Par la suite, en fonction du poids du porcelet, les trois doses d'exposition moyenne sur les 14 jours d'exposition en µgcontaminant/kgPV/jour pour chaque sol ont été calculées et utilisées pour tracer les courbes dose-réponse. A partir des valeurs présentées dans le tableau 12 et en prenant en considération les valeurs de bioaccessibilité des contaminants dans les sols, les doses d'exposition pour chaque forme de référence ont été déterminées. Pour **les courbes de référence, 5 doses d'exposition ont été administrées** et les valeurs, pour chaque forme de référence, sont présentées dans le tableau 13.

Tableau 13: Doses d'exposition utilisées pour chaque forme de référence

Acétate de plomb (µgPb/kgPV/jour)			**Arséniate de sodium (µgAs/kgPV/jour)**	
Dose 1	50		Dose 1	10
Dose 2	500		Dose 2	25
Dose 3	1000		Dose 3	50
Dose 4	2000		Dose 4	100
Dose 5	4000		Dose 5	200
Chlorure de cadmium (µgCd/kgPV/jour)			**Antimoniate de potassium (µgSb/kgPV/jour)**	
Dose 1	10		Dose 1	10
Dose 2	25		Dose 2	25
Dose 3	50		Dose 3	50
Dose 4	75		Dose 4	100
Dose 5	150		Dose 5	300

I.6) La procédure expérimentale

Les expériences ont été réalisées en respectant les règles pour la recherche animale établies par le ministère français de l'agriculture. Lors de leur arrivée pour le début de l'expérience les porcelets sont âgés de 28 jours. Avant le premier jour d'exposition, les porcelets pesaient en moyenne 9,5 ± 1,2 kg (n= 168 porcelets). Pour l'expérience, **12 cages métaboliques** individuelles permettant la séparation des fécès et des urines ont été utilisées.

Pour chaque forme de référence (5 doses d'exposition) et pour chaque sol (3 doses d'exposition) trois porcelets par dose ont été utilisés. Il est important de noter que les porcelets ont été exposés aux quatre formes de référence en même temps afin de limiter le nombre de modalités et prenant en compte ainsi les potentielles interactions entre les contaminants. De ce fait, en disposant de 12 cages métaboliques, l'ensemble **des modalités a été aléatoirement réparti dans 14 lots de 12 porcelets**. Chaque lot comprenait un porcelet témoin non exposé.

Pour chaque lot, la même démarche expérimentale a été développée et celle-ci est succinctement présentée sur la figure 10. Après le sevrage, les porcelets ont été placés en période **d'adaptation**, pendant **6 jours**, durant laquelle, ils n'ont pas été exposés aux contaminants mais conditionnés à ingérer deux fois par jour une « boulette » de nourriture non contaminée distribuée directement à la main. Pendant la période **d'exposition de 14 jours,** une **dose unique** de sol ou d'une forme de référence a été administrée quotidiennement **à 9h, après une nuit à jeun, soit 12 heures après le dernier repas**. Pour exposer les porcelets aux contaminants du sol ou aux formes de référence, la dose d'exposition est placée au centre d'une « boulette » de nourriture humidifiée (moins de 4 g) puis administrée à chaque porcelet directement à la main. Une étude de l'USEPA portant sur la biodisponibilité de l'arsenic montre qu'il n'y a pas de différence dans l'absorption lorsque les porcelets sont exposés aux sols par gavage ou alors par la prise d'une boulette contaminée (USEPA, 2005). Donc, la quantité de nourriture utilisée pour exposer les porcelets n'affecte pas l'absorption. De plus, les conditions à jeun ont été utilisées afin d'obtenir la plus grande solubilisation possible des contaminants dans le tractus gastro-intestinal et éviter également les interactions avec les composés de la nourriture (Rabinowitz *et al.*, 1980 ; Oomen *et al.*, 2006).







6 jours d'adaptation

- Acclimater les porcelets
- Observer la santé des porcelets avant de commencer l'exposition
- Adapter les porcelets à la prise d'une « boulette humidifiée » de nourriture (4g environ) non contaminée par voie orale directement via la main à 9h et 16h quotidiennement pendant les 6 jours
- Eau et nourriture disponible *ad libitum*

14 jours d'exposition

- Les porcelets sont exposés aux formes de référence ou aux sols contaminés via la prise quotidienne d'une « boulette » par voie orale à 9h après une nuit à jeun.
- La quantité de nourriture correspond à 4% du poids vif moyen des 12 porcelets. Les porcelets sont nourris à 10h et 17h.
- Les doses d'exposition et la quantité de nourriture sont ajustées à la croissance des porcelets. Pour cela, les porcelets sont individuellement pesés tous les trois jours.
- L'eau est disponible *ad libitum*

Abattage

- **Collecte des urines de J11 à J13 de l'exposition**
- **Prélèvement foie, reins et les deux pattes antérieures**

Traitement des échantillons et analyses par ICP-MS

Figure 10 : Dispositif expérimental utilisé durant les 14 lots

Durant, la totalité de l'expérience, les animaux ont reçu une alimentation dédiée aux porcelets en post-sevrage. Cette alimentation a été analysée et elle contenait moins de 1,00 ± 0,01 µg/kg d'éléments métalliques (Pb, Cd, As et Sb), ce qui correspond à une ingestion quotidienne inférieure à 0,005 µg/kgPV d'éléments métalliques soit pour le plomb $7*10^{-4}$ % de la dose d'exposition la plus faible et pour les trois autres contaminants $5*10^{-2}$ % de la dose d'exposition la plus faible.

La nourriture était disponible à volonté durant la période d'adaptation, alors que durant **les 14 jours d'exposition, la portion de nourriture quotidienne était ajustée à 4% du poids vif moyen des douze porcelets** composant chaque lot. De plus, la portion de nourriture était distribuée en **deux fractions égales de 2% du poids vif et distribuée à 10h, soit 1 heure après l'exposition, et à 17h**. La quantité de nourriture et les **doses individuelles d'exposition étaient ajustées tous les trois jours**. Cet ajustement est basé sur une **pesée individuelle de chaque porcelet après une nuit à jeun**. L'eau du robinet, était disponible à volonté durant la totalité de l'expérience. Au début de chaque nouveau lot de porcelet, un échantillon d'eau du robinet a été prélevé. Les analyses ont montré que les concentrations d'éléments métalliques dans l'eau étaient inférieures à la limite de quantification (1 µg/l).

I.7) Prélèvement et traitement des compartiments cibles

La figure 11 détaille les différentes étapes de prélèvement et de préparation des différents échantillons. Les échantillons d'urine ont été collectés durant 48 heures à partir du jour d'exposition 11. Chaque échantillon d'urine a été pesé puis homogénéisé et un aliquote de 250 ml par échantillon a été prélevé, acidifié (2% HNO_3) et congelé à -20°C. Ensuite, au jour d'exposition 14, les porcelets ont été anesthésiés au minimum 5 heures après la dernière dose d'exposition, par injection de phénobarbital (1ml/kg PV) suivi par une exsanguination, après une nuit à jeun. Suite à l'exsanguination, le foie, les reins et les deux pattes antérieures ont été collectées. Les échantillons de foie et les reins ont été pesés puis découpés et finalement congelés à -20°C. Les deux pattes antérieures de chaque porcelet ont été congelées à -20°C.

Par la suite, les échantillons de foie et de reins ont été séchés à 40°C puis la totalité de chaque organe a été broyée à l'aide d'un broyeur à billes afin de passer au travers d'un tamis de 250 µm et les échantillons ont été pesés.

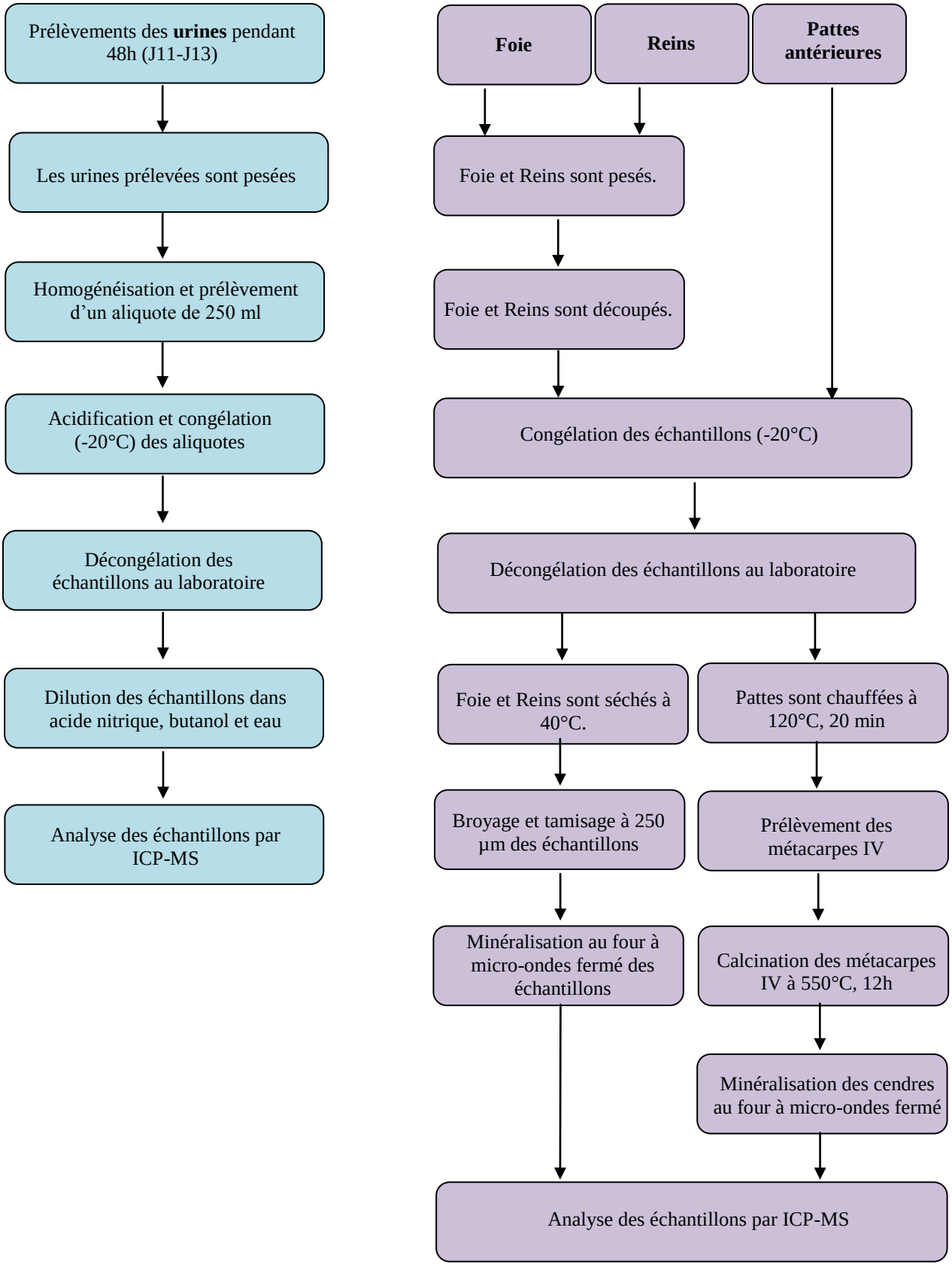


Figure 11 : Résumé des différentes étapes de prélèvement et de préparation des échantillons pour l'analyse

En parallèle, 5 grammes de chaque échantillon broyé et séché de foie et de rein ont été placés à 103°C pendant 48h puis pesés afin de déterminer la matière sèche de chaque organe. Les pattes antérieures de chaque porcelet ont été mises à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes afin de faciliter la séparation des tissus et l'extraction de chaque métacarpe IV. Finalement, les métacarpes IV de chaque porcelet ont été congelés à -20°C avant d'être analysés.

I.8) Analyses des échantillons

Les concentrations en éléments traces métalliques ont été déterminées en triplicat dans l'urine, l'os, le foie et les reins pour chaque dose d'exposition. 1 ml d'urine a été dilué dans l'acide nitrique (2% v/v) et dans du butanol (2% v/v) puis le volume a été ajusté à 10 ml avec de l'eau Milli-Q. Le mélange a été agité manuellement et analysé directement par ICP-MS (ELAN 6100 DRC, Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France). 1 gramme d'échantillon séché de foie et de rein a été minéralisé par digestion au four à micro-ondes en milieu fermé (CEM, Marx Xpress, Saclay, France) dans un tube en téflon avec l'ajout de 6 ml d'acide nitrique (15 N). Les deux métacarpes IV de chaque porcelet ont été longitudinalement sectionnés, séchés à 103°C pendant toute une nuit puis pesés. La totalité de chaque métacarpe a été calcinée à 550°C durant 12 heures dans un four à moufles puis les cendres obtenues ont été finement broyées et homogénéisées. Finalement, 0,5 g de cendre a été solubilisé avec 6 ml d'acide nitrique (15 N) et minéralisé par digestion au four à micro-ondes en milieu fermé. Après la minéralisation, le volume des échantillons (foie, rein et os) a été ajusté à 30 ml avec de l'eau Milli-Q. L'ensemble des échantillons a été ensuite analysé par ICP-MS. Les limites de quantification des contaminants, dans chaque compartiment cible, ont été déterminées par le biais de dix réplicats en se référant à la norme NFT 90-210. Chaque contaminant a la même valeur de limite de quantification dans chaque compartiment cible. Les valeurs sont les suivantes : 10 µg/kg MS pour le foie ; 10 µg/kg MS pour les reins ; 0,02 µg/g de cendres pour l'os et 0,5 µg/l pour l'urine.

I.9) Contrôle qualité de l'expérience *in vivo*

Afin de s'assurer de la qualité de la préparation et du dosage des échantillons, de nombreuses étapes ont été entreprises :

- Blanc et matériaux de référence :

Des échantillons de référence certifiés ont été incorporés dans chaque cycle de minéralisation au four à micro-ondes en milieu fermé et durant les analyses par ICP-MS dans le but de vérifier le bon déroulement de la minéralisation, l'absence de contamination et l'exactitude des résultats d'analyses.

- Analyses :

Tous les échantillons ont été minéralisés et analysés en triplicat dans le but de vérifier l'homogénéité des échantillons, la précision et la répétabilité des analyses. Les résultats présentés seront la moyenne des trois réplicats obtenus pour chacun des échantillons. De plus, pour chaque série d'analyse, un étalon de contrôle (50% du point haut de la gamme d'étalonnage) et un blanc de réactifs ont été placés tous les 8 échantillons afin de vérifier le bon déroulement de l'analyse, la non contamination entre les échantillons et la possible dérive de la réponse de l'appareil dans le temps.

I.10) Analyses statistiques des données

Pour chaque compartiment cible, la biodisponibilité relative est calculée par l'ajustement des données à un modèle dose-réponse approprié. Le modèle d'ajustement peut être linéaire ou non linéaire en fonction des compartiments cibles utilisés et de la gamme des doses d'exposition. Cependant, comme détaillé précédemment, plusieurs critères doivent être respectés pour estimer la biodisponibilité relative.

Ainsi, une procédure statistique a été mise en place afin de vérifier ces différents critères dans le but d'estimer rigoureusement la biodisponibilité relative de chaque contaminant pour les 16 sols et de déterminer l'incertitude de chacune de ces valeurs. Pour cela, les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SAS 9.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Le porcelet a été utilisé comme unité expérimentale. Dans un premier temps, une analyse de la covariance a été utilisée afin de vérifier si la réponse pour un contaminant donné dans chacun des compartiments cibles est linéaire ou quadratique. Lorsque les concentrations en contaminant n'ont pas pu être quantifiées, les données ont été retirées de l'analyse statistique.

L'analyse statistique se déroule en plusieurs étapes successives :

- Chacune des courbes dose-réponse est ajustée à un modèle linéaire et quadratique. Puis, le modèle le plus significatif ($p < 0,05$) est utilisé.

- Pour toutes les courbes dose-réponse obtenues pour un compartiment cible et un contaminant donné, les valeurs des ordonnées à l'origine ont été comparées à la valeur moyenne de l'ordonnée à l'origine obtenue pour les porcelets témoin afin de vérifier qu'il n'y a pas de différence significative ($p > 0,05$).

- Ensuite, pour chaque compartiment et chaque contaminant, la valeur de la pente de chaque courbe dose-réponse est estimée avec son incertitude associée puis comparée à la valeur de la pente de la courbe dose-réponse de la forme de référence (différence significative si $p < 0,05$).

- Si les pentes ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$), la biodisponibilité relative ne sera pas calculée mais sera considérée par défaut comme étant égale à 100%. Cependant, ces valeurs ne seront pas utilisées pour l'étude des corrélations *in vivo/in vitro*.

- Si les pentes sont significativement différentes, la biodisponibilité relative est déterminée par le rapport des valeurs de pentes (sol par rapport à forme de référence)

- Comme décrit par Finney (1978) puis repris par Littel *et al.* (1997) et au sein de l'étude de l'USEPA (2007b), l'intervalle de confiance de la biodisponibilité relative a été déterminé comme étant le ratio des incertitudes de chaque pente (Théorème de Fieller).

- Finalement, le coefficient de détermination (r^2) de chaque modèle généré a été calculé comme le carré du coefficient de corrélation entre les valeurs prédites et observées. De même pour chaque modèle, l'écart type résiduel (ETR) a été calculé comme la racine carrée des différences entre les valeurs prédites et les valeurs observées divisé par le nombre d'observations. Finalement, le coefficient de variation (CV) du modèle est calculé. Ces différentes valeurs serviront à définir le compartiment cible le plus approprié pour ajuster les données (valeur de r^2 élevée, valeurs de ETR et CV faibles).

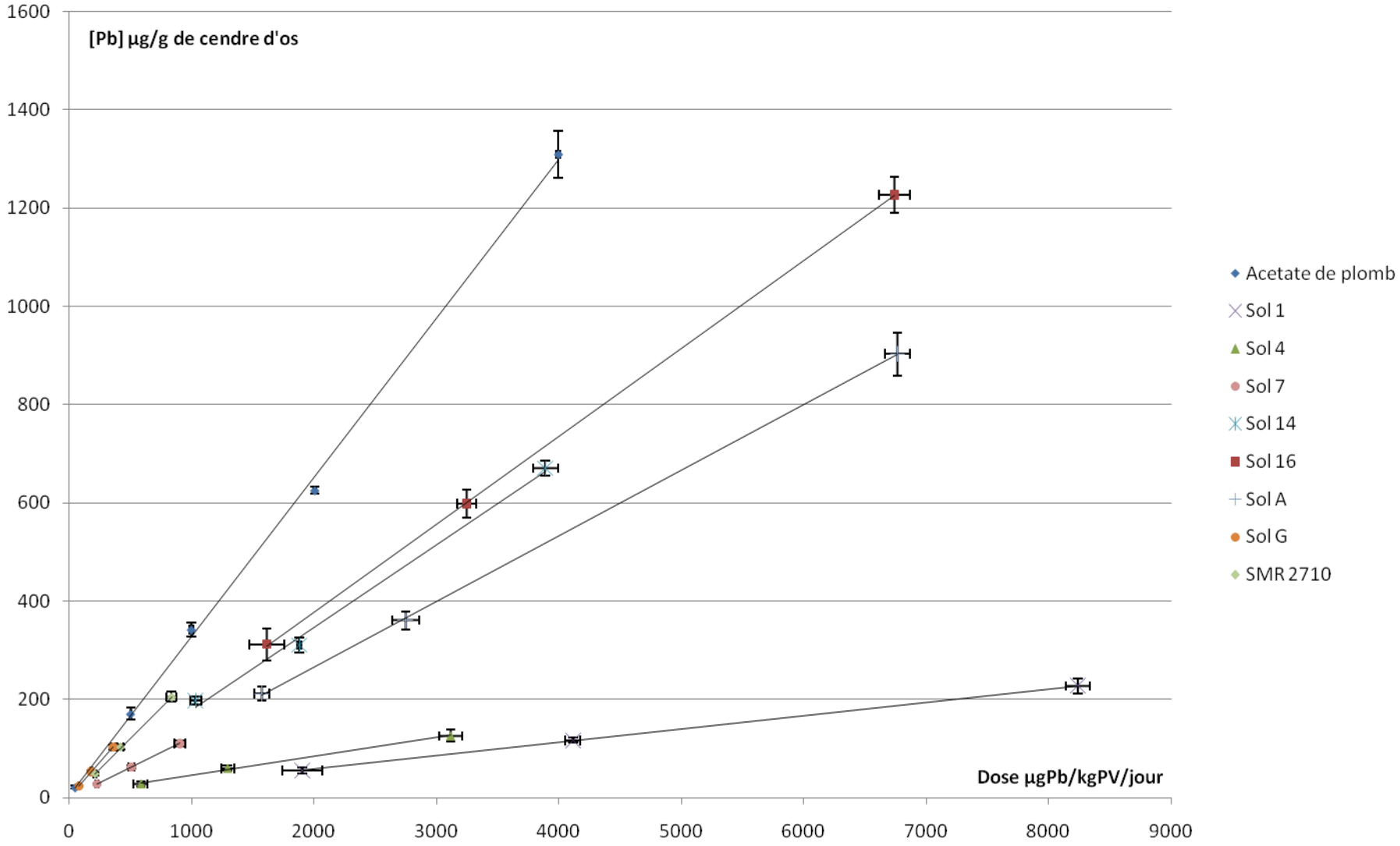


Figure 12 : Exemple de courbes dose-réponse obtenues pour différents sols et pour l'acétate de plomb dans l'os (Moyenne ± écart-type, n=3)

II.) Résultats et discussion

II.1) Impact des doses d'exposition sur les porcelets

La répartition aléatoire des différentes doses d'exposition pour l'ensemble des sols et formes de référence utilisés dans le dispositif expérimental a permis de prendre directement en compte dans les résultats l'impact des différents lots de porcelets. Pour l'ensemble des 14 séries composant l'expérience *in vivo*, les animaux restaient en bonne santé consommant leur nourriture normalement et ayant une croissance (prise de poids) normale. Au cours de l'expérimentation, aucun décès n'est survenu. Les résultats montrent qu'il n'y a pas de corrélation entre les différentes doses d'exposition pour chaque contaminant et le poids final de chaque porcelet ($r = -0,36$; $p > 0,05$; $n=168$). De même, il n'y a pas d'impact des doses d'exposition sur le poids final de chaque organe cible (foie, reins, et os) ($p > 0,05$). Il faut noter que pour l'ensemble des porcelets témoin, les concentrations en contaminant dans chacun des compartiments cibles sont inférieures aux limites de quantification et donc ces valeurs ne seront pas utilisées pour tracer les courbes dose-réponse pour chacun des contaminants.

II.2) Les courbes dose-réponse des ETM au sein de chaque compartiment cible

Les courbes dose-réponse ont été tracées pour chaque sol et forme de référence et pour chaque compartiment cible afin de pouvoir estimer la biodisponibilité relative des ETM. Toutes les courbes dose-réponse pour chaque contaminant sont présentées en annexe 3. Dans un souci de synthèse des données du document, seuls quelques exemples de courbes dose-réponse sont présentés. Par contre, tous les résultats de l'analyse statistique de chacune des courbes dose-réponse sont présentés et commentés.

Pour déterminer la biodisponibilité relative, plusieurs conditions détaillées précédemment doivent être respectées. Ainsi, pour l'ensemble des contaminants, l'analyse de covariance en randomisation totale a permis de mettre en évidence que les ordonnées à l'origine des courbes dose-réponse pour les sols ne sont pas significativement différentes de l'ordonnée à l'origine des courbes dose-réponse obtenue pour chaque forme de référence ($p > 0,05$). Les caractéristiques des modèles (linéarité, pente) pour chaque contaminant sont présentées ci-dessous.

II.2.1) Les courbes dose-réponse pour le plomb

Pour les 16 sols contaminés, les courbes dose-réponse du plomb dans chacun des compartiments ont pu être établies. Cependant, les résultats obtenus dans le foie pour la forme de référence et certains sols diffèrent des autres compartiments cibles. De ce fait, les résultats pour le foie sont présentés séparément.

- *Courbes dose-réponse pour le rein, l'os et l'urine*

Les résultats statistiques montrent que le modèle linéaire appliqué pour les reins, l'os et l'urine est hautement significatif pour la forme de référence sur la totalité de la gamme d'exposition (0 à 4000 µgPb/kgPV/jour) et pour l'ensemble des sols contaminés ($p > 0,05$ pour le modèle quadratique et $p < 0,01$ pour le modèle linéaire). Les études de référence menées par l'USEPA, qui utilisent des doses d'exposition plus faibles (0 à 225 µgPb/kgPV/jour pour l'acétate de plomb et de 0 à 675 µgPb/kgPV/jour pour 19 sols) montrent également que les réponses sont significativement ajustées à un modèle linéaire pour les reins et l'os (l'urine n'est pas utilisée dans ces études) (USEPA, 2004 ; Casteel *et al.*, 2006 ; USEPA, 2007b). Ainsi, en complément des résultats de l'USEPA, ceux de l'étude montrent qu'il est possible d'obtenir des réponses linéaires sur une plus large gamme.

La figure 12 regroupe des courbes dose-réponse obtenues pour différents sols et la forme de référence dans l'os. Les résultats présentés sur cette figure montrent bien que les pentes des courbes diffèrent d'un sol à un autre.

Le tableau 14 résume les valeurs des pentes des courbes dose-réponse pour l'ensemble des sols et la forme de référence. Les résultats de l'analyse statistique montrent ainsi que pour l'urine et l'os, seules les pentes des sols F, G et H ne sont pas significativement différentes de la pente obtenue pour l'acétate de plomb ($p>0,05$). Les résultats obtenus pour le rein montrent qu'il n'y a plus que les pentes des sols G et H qui ne sont pas significativement différentes de celle de l'acétate de plomb ($p > 0,05$). Le tableau 14 présente également l'erreur standard pour chacune des pentes. De manière globale, les erreurs sur l'estimation des pentes sont relativement faibles dans chacun des compartiments. Il faut noter tout de même, que pour les sols faiblement contaminés engendrant ainsi des doses d'exposition relativement faibles et/ou les sols dont la pente est très faible par rapport à la pente de la forme de référence (c'est-à-dire faible biodisponibilité), les erreurs d'estimation sur la pente sont légèrement plus importantes (par exemple les sols 1,2, 7, 10, F, G et H).

Tableau 14 : Estimation des pentes des courbes dose-réponse obtenues pour le plomb au sein de chacun des compartiments cibles

	Rein		Urine		Os		Foie	
	pente	Erreur standard pente (%)	pente	Erreur standard pente (%)	pente	Erreur standard pente (%)	pente	Erreur standard pente (%)
Acétate de plomb	4,0	0,8	0,098	1,0	0,300	0,9	3,6	1,1
Sol 1	0,3§	15,0	0,008§	16,8	0,03§	13,2	0,4§	16,0
Sol 2	0,3§	12,0	0,001§	12,2	0,019§	18,4	0,4§	12,2
Sol 4	0,8§	7,0	0,020§	9,6	0,039§	14,6	0,7§	8,3
Sol 5	1,0§	7,4	0,031§	8,1	0,109§	6,5	1,0§	6,0
Sol 7	1,3§	14,9	0,033§	18,3	0,121§	15,9	1,3§	10,0
Sol 10	0,9§	17,2	0,030§	16,1	0,100§	14,0	0,8§	12,3
Sol 14	2,0§	2,8	0,044§	4,1	0,168§	3,2	1,4§	3,5
Sol 15	2,3§	1,7	0,058§	2,1	0,195§	1,8	ND	ND
Sol 16	2,5§	2,8	0,052§	2,3	0,179§	2,1	ND	ND
Sol A	1,2§	3,2	0,028§	4,7	0,134§	2,8	1,0§	3,8
Sol C	1,9§	9,5	0,038§	15,0	0,135§	12,2	1,1§	10,8
Sol D	2,0§	8,3	0,055§	10,0	0,147§	10,8	1,4§	8,2
Sol F	3,0§	18,6	0,069	25,9	0,238	21,8	2,9§	12,3
Sol G	3,3	19,0	0,082	23,0	0,270	21,1	2,8§	13,8
Sol H	3,5	14,0	0,079	19,8	0,284	16,0	3,1§	9,7
Sol SMR 2710	3,1§	8,8	0,080§	10,0	0,251§	10,0	3,0§	5,7
r^2		0,999		0,998		0,998		0,996
ETR		170		5		16		107
CV(%)		5		7		6		7

§montre une différence significative entre la pente déterminée pour le sol et celle obtenue pour la forme référence ($p<0,05$)ETR : Ecart-Type Résiduel ; CV : Coefficient de variation, ND : Non déterminée car modèle non linéaire pour ces deux sols dans le compartiment foie

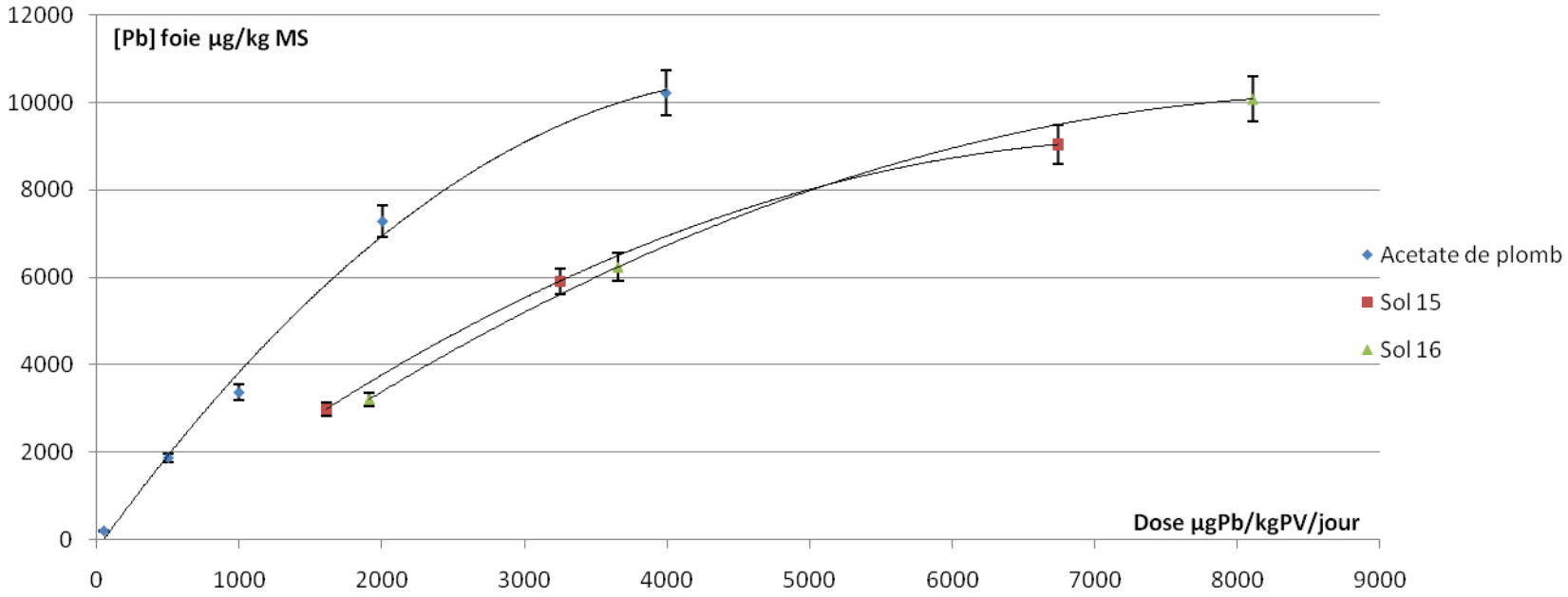


Figure 13 : Courbes dose-réponse obtenues pour les sols 15 et 16 et pour l'acétate de plomb dans le foie (Moyenne ± écart-type, n=3)

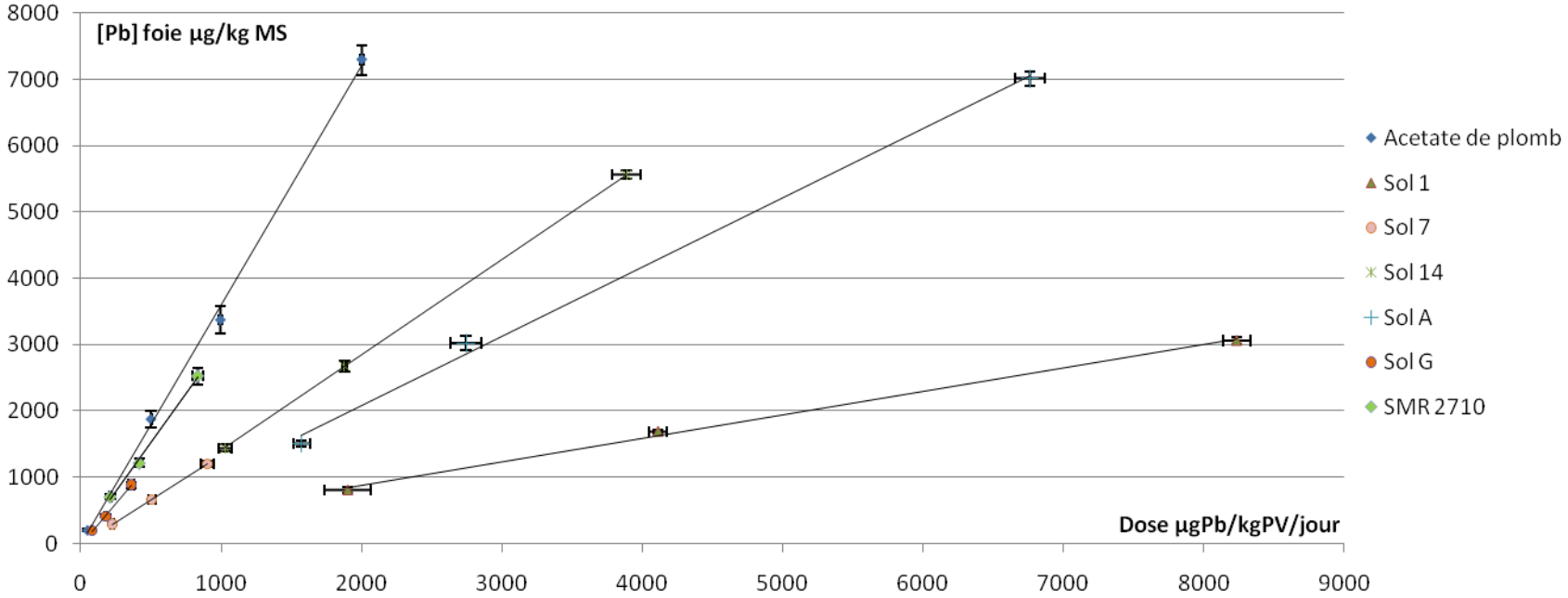


Figure 14: Exemple de courbes dose-réponse obtenues pour différents sols et pour l'acétate de plomb dans le foie (Moyenne ± écart-type, n=3)

- *Les courbes dose-réponse pour le foie*

La figure 13 montre qu'une réponse quadratique est obtenue pour la forme de référence en considérant la totalité de la gamme d'exposition ainsi que pour les sols 15 et 16 ($p<0,05$). Pour les autres sols contaminés, une réponse linéaire est obtenue ($p<0,05$). Pour la forme de référence (acétate de plomb), en retirant la dose la plus importante (4000 µgPb/kgPV/jour), une réponse linéaire significative est également obtenue ($p<0,05$). Ainsi, pour le foie, les comparaisons de pente a été réalisée sur la gamme d'exposition de 0 à 2000 µgPb/kgPV/jour pour la forme de référence afin d'être dans le domaine linéaire de la réponse. Les études de l'USEPA ont montré qu'une réponse linéaire a été obtenue dans le foie pour une gamme d'exposition de 0 à 675 µgPb/kgPV/jour (Casteel *et al.*, 2006 ; USEPA, 2007b). Pour les sols 15 et 16, le fait qu'il n'y ait que trois doses d'exposition empêche de retirer la dose la plus élevée pour être dans la partie linéaire de la réponse. Par conséquent, il a été impossible d'estimer la biodisponibilité relative du plomb pour ces deux sols via les données obtenues dans le foie. Des exemples de courbes dose-réponse linéaires obtenus dans le foie pour différents sols et la forme de référence sont présentés sur la figure 14.

Le tableau 14 résume les différentes valeurs de pente obtenues pour les sols contaminés et l'erreur standard estimée pour chacune de ces pentes. Au contraire des résultats obtenus pour les compartiments cibles précédents, les analyses statistiques montrent que les pentes des sols contaminés sont toutes significativement différentes de la pente mesurée pour l'acétate de plomb. Par contre, l'erreur standard sur les pentes est toujours légèrement plus importante pour les sols faiblement contaminés et les sols possédant une valeur de pente faible.

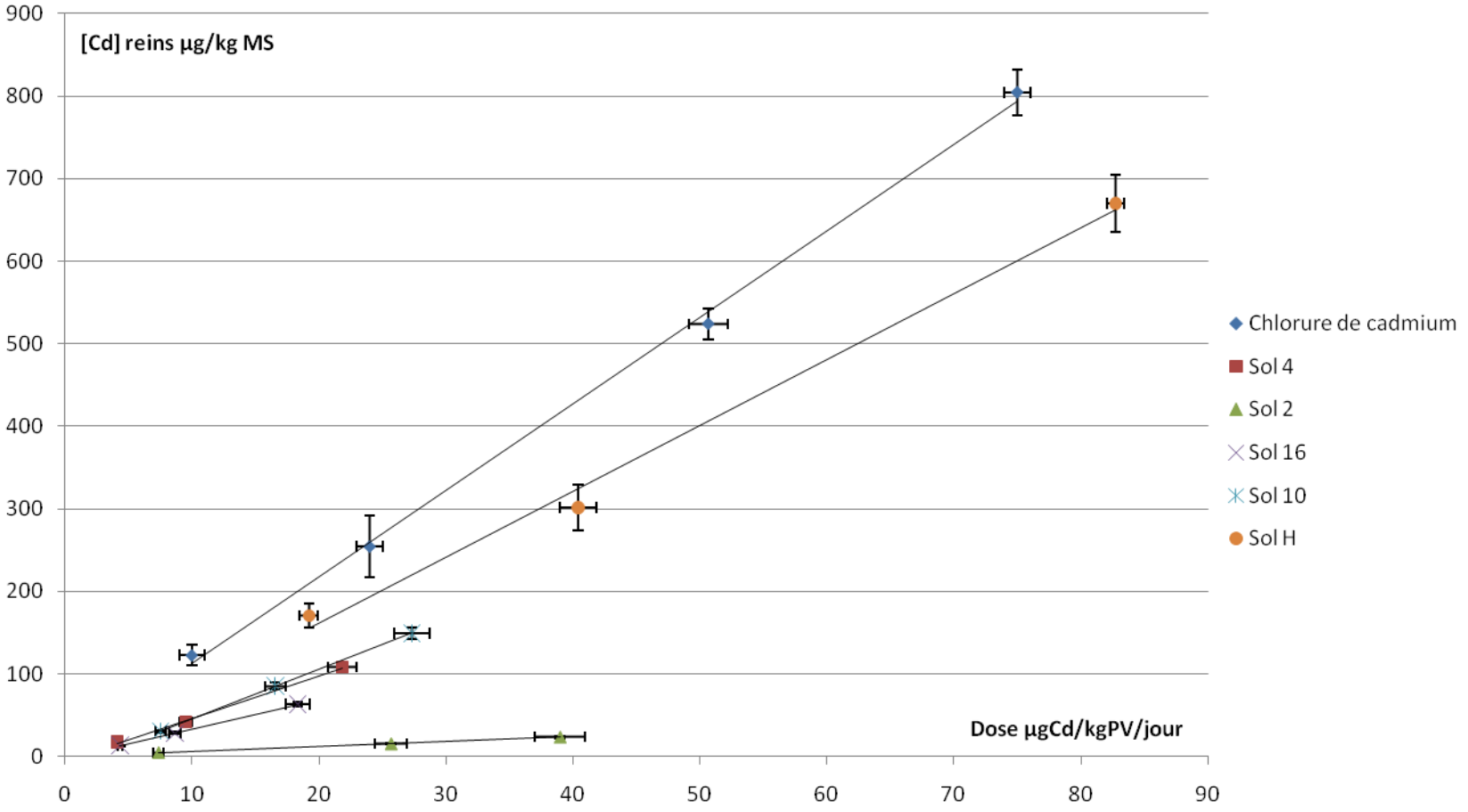


Figure 15 : Exemple de courbes dose-réponse obtenues pour différents sols et pour le chlorure de cadmium dans les reins (Moyenne ± écart-type, n=3)

II.2.2) Les courbes dose-réponse pour le cadmium

Les résultats statistiques montrent que les réponses du cadmium dans les quatre compartiments cibles sont significativement linéaires pour la forme de référence sur la totalité de la gamme d'exposition (0 à 150 µgCd/kgPV/jour) ($p<0,05$). Dans la littérature seule une étude présente les résultats *in vivo* de la détermination de la biodisponibilité relative du cadmium dans les sols par exposition par voie orale chez le porcelet (Schroder *et al.*, 2003). Dans cette étude, les auteurs utilisent uniquement le rein comme compartiment cible et montrent que les réponses à l'exposition par voie orale chez le porcelet au chlorure de cadmium et aux sols contaminés sont linéaires pour des doses d'exposition variant de 0,6 à 160 µgCd/kgPV/jour. La figure 15 présente un exemple de courbes dose-réponse obtenues au sein du compartiment rein pour différents sols et pour la forme de référence du cadmium.

Le tableau 15 regroupe les caractéristiques des courbes dose-réponse pour l'ensemble des sols et la forme de référence au sein de chaque compartiment cible. Premièrement, les résultats montrent que pour six sols (1, 5, A, D, G et H) les courbes dose-réponse n'ont pu être obtenues dans aucun des compartiments cibles. Ceci peut s'expliquer par les faibles concentrations en cadmium et probablement par la faible biodisponibilité du cadmium dans ces sols. Au-delà de l'impossibilité d'obtenir une réponse pour certains sols, les résultats montrent que la sensibilité de la réponse à l'exposition du cadmium est différente en fonction des compartiments cibles. En effet, le tableau 15 montre que les courbes dose-réponse sont obtenues pour 10 sols pour le rein, 6 sols pour l'urine, 8 sols pour l'os et 6 sols pour le foie. Toutes les courbes dose-réponse obtenues pour chacun des sols, au sein des quatre compartiments cibles, présentent une pente significativement différente de celle de la forme de référence ($p < 0,05$). Les courbes dose-réponse n'ont pas pu être obtenues pour le matériau de référence SMR 2710, quel que soit le compartiment cible.

Afin d'estimer la qualité de chaque réponse, le tableau 15 présente également l'erreur standard obtenue pour chacune des pentes dans chacun des compartiments. Ces valeurs sont variables en fonction de la concentration et de la biodisponibilité du cadmium dans les sols et sont comprises entre 2% à 40%.

Tableau 15 : Estimation des pentes des courbes dose-réponse obtenues pour le cadmium au sein de chacun des compartiments cibles

	Rein		Urine		Os		Foie	
	Pente	Erreur standard pente (%)	Pente	Erreur standard pente (%)	Pente	Erreur standard pente (%)	Pente	Erreur standard pente (%)
Chlorure de cadmium	10,8	0,5	1,02	0,2	0,33	0,9	4,25	0,7
Sol 1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sol 2	0,9§	38	0,15§	26	0,04§	37	0,51§	29
Sol 4	5,1§	9	0,45§	15	0,13§	12	2,02§	12
Sol 5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sol 7	3,9§	20	ND	ND	0,09§	21	ND	ND
Sol 10	6,0§	7	0,63§	10	0,20§	11	2,18§	11,1
Sol 14	1,8§	40	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sol 15	5,3§	8,8	0,56§	12,5	0,15§	18	1,83§	14,8
Sol 16	4,1§	16	0,36§	14	0,12§	20	1,75§	19,4
Sol A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sol C	9,6§	20	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sol D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sol F	8,7§	24	ND	ND	0,25§	30	ND	ND
Sol G	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sol H	8,0§	2,5	0,78§	2,56	0,27§	2,8	3,2§	2,5
Sol SMR 2710	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
r^2	0,999		0,996		0,997		0,998	
ETR	10,5		1,2		0,6		7,6	
CV(%)	6,7		29		10,5		8,4	

§ montre une différence significative entre la pente déterminée pour le sol et celle obtenue pour la forme référence ($p<0,05$)
ETR : Ecart-type résiduel ; CV : Coefficient de variation ; ND : Non déterminée car valeurs inférieures à la limite de quantification dans le compartiment considéré

II.2.3) Les courbes dose-réponse pour l'arsenic

Les études publiées sur la biodisponibilité *in vivo* de l'arsenic utilisent uniquement l'urine comme compartiment cible (Roberts *et al.*, 2000 ; USEPA, 2003 ; Roberts *et al.*, 2006). Par exemple, l'USEPA détermine la biodisponibilité relative de l'arsenic chez le porcelet par dosage de l'arsenic excrété dans l'urine pour une gamme de dose d'exposition variant de 0 à 75 µgAs/kgPV/jour (USEPA, 2005). Les résultats obtenus ici confirment qu'une réponse linéaire significative ($p < 0,05$) est obtenue pour l'urine pour une gamme d'exposition variant de 0 à 200 µgAs/kgPV/jour. La figure 16 montre des exemples de courbes dose-réponse obtenues pour différents sols et la forme de référence de l'arsenic excrété via l'urine.

Les résultats de l'étude montrent qu'il est également possible d'obtenir une réponse linéaire sur cette gamme d'exposition en se basant sur les données du foie, des reins et des os. Le tableau 16 résume les valeurs des pentes des courbes dose-réponse pour l'ensemble des sols et la forme de référence au sein de chaque compartiment cible. Premièrement, pour deux sols (sol 7 et sol F) aucune donnée n'a pu être obtenue quel que soit le compartiment cible. Ceci peut s'expliquer par les faibles concentrations en arsenic dans ces sols et probablement couplée à une faible biodisponibilité de l'arsenic dans ces deux sols.

Le tableau 16 indique que les caractéristiques des courbes dose-réponse sont obtenues pour 11 sols pour le rein, 14 sols pour l'urine, 11 sols pour l'os et 11 sols pour le foie. La sensibilité de la réponse à l'exposition à l'arsenic est différente en fonction des compartiments cibles. Cette différence de sensibilité peut s'expliquer par le fait que l'arsenic absorbé est majoritairement excrété via l'urine. En se basant sur les données obtenues dans le cadre de l'étude pour l'arséniate de sodium, l'arsenic excrété via l'urine correspond à environ 70% de la dose ingérée. L'étude de l'USEPA (2003, 2005) indique que chez l'homme l'excrétion de l'arsenic via l'urine est également dose-dépendante est qu'elle est en moyenne de 67% (gamme variant de 45% à 85%). Freeman *et al.* (1995) montrent que l'arsenic administré par intraveineuse à trois singes est mesuré à 76,5% dans l'urine et 3,2% dans les fécès. Ces résultats sont concordants et confirment qu'une forme soluble d'arsenic est fortement absorbée puis excrétée via l'urine et qu'une fraction de l'arsenic administré est stockée dans l'organisme.

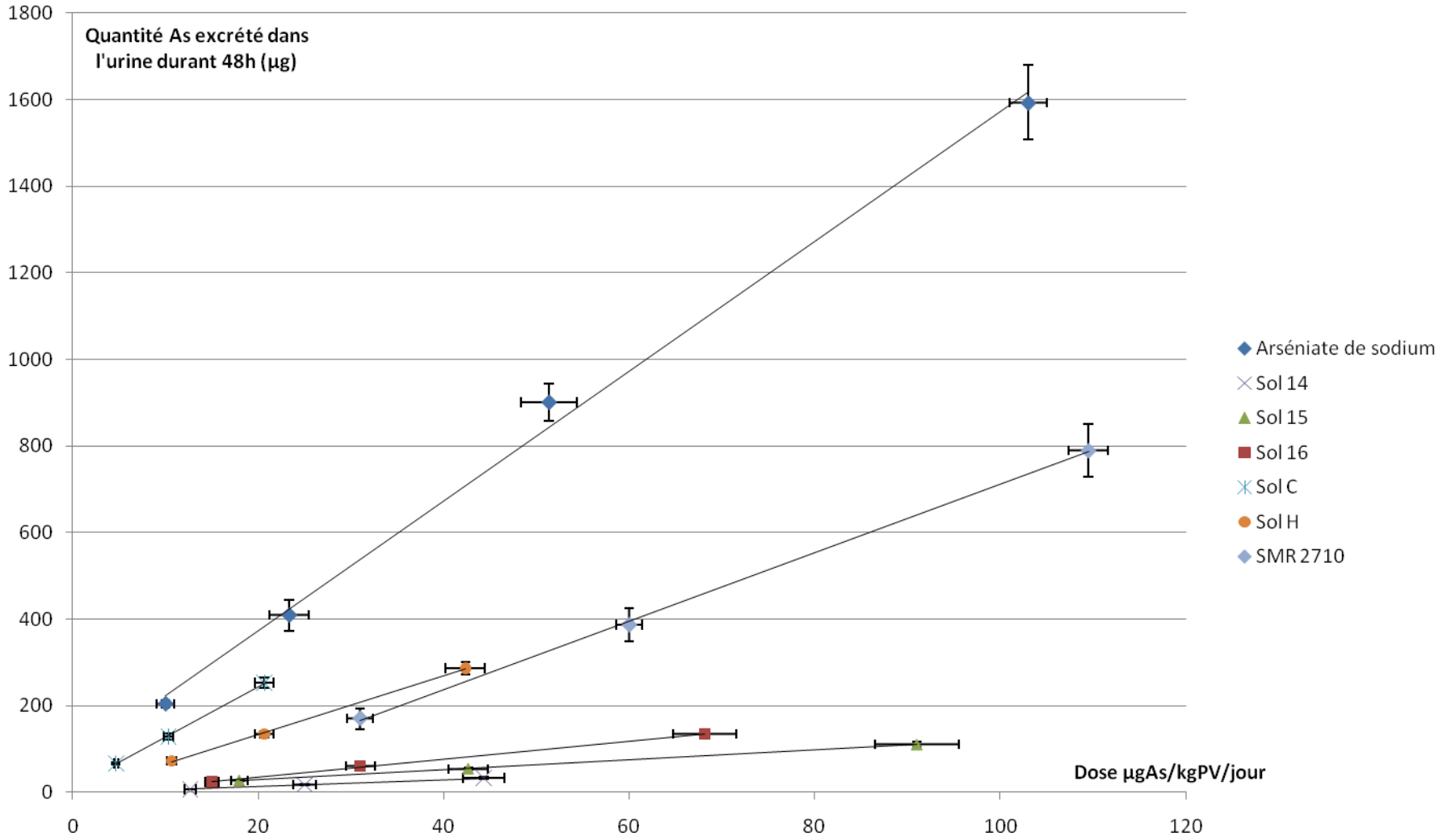


Figure 16 : Exemple de courbes dose-réponse obtenues pour différents sols et pour l'arséniate de sodium dans l'urine (Moyenne ± écart-type, n=3)

Pour les courbes dose-réponse obtenues dans le rein et le foie, chaque pente déterminée pour un sol donné est significativement différente de la pente obtenue pour la forme de référence ($p < 0,05$). Pour l'urine, sur les 14 sols pour lesquels les courbes dose-réponse ont pu être obtenues, il n'y a que le sol G pour lequel la pente de la courbe dose-réponse n'est pas significativement différente de la pente de la courbe de référence ($p > 0,05$). Les résultats pour l'os, montrent qu'il n'y a que la pente de courbe dose-réponse pour le sol C qui n'est pas significativement différente de la pente de la forme de référence obtenue dans l'os.

Finalement, pour les sols dont les concentrations en arsenic sont plutôt faibles (donc faibles doses d'exposition) et possédant une pente relativement faible, par exemple les sols 4, 5, 14 ou encore le sol A, l'erreur standard sur l'estimation de la pente de chacun de ces sols est relativement importante (Tableau 16).

Tableau 16 : Estimation des pentes des courbes dose-réponse obtenues pour l'arsenic au sein de chacun des compartiments cibles

	Rein		Urine		Os		Foie	
	Pente	Erreur standard pente (%)	Pente	Erreur standard pente	Pente	Erreur standard pente	Pente	Erreur standard pente
Arséniate de Sodium	29,4	0,6	16,2	0,9	0,42	1	16,9	0,7
Sol 1	0,69§	33	0,46§	41	0,02§	30	0,67§	23
Sol 2	0,77§	24	0,55§	29	0,013§	38	0,72§	18
Sol 4	5,0§	41	1,9§	95	0,06§	75	1,9§	73
Sol 5	0,58§	69	0,66§	78	0,014§	74	0,49§	80
Sol 7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sol 10	2,5§	35	1,9§	41	0,04§	45	1,9§	32
Sol 14	1,6§	70	0,81§	72	0,015§	69	0,76§	71
Sol 15	2,3§	21	1,2§	41	0,03§	30	1,1§	33
Sol 16	3,1§	23	2,4§	30	0,03§	40	1,7§	30
Sol A	ND	ND	9,03§	70	ND	ND	ND	ND
Sol C	19,5§	12	11,7§	18	0,31	23	11,9§	13
Sol D	ND	ND	5,7§	43	ND	ND	ND	ND
Sol F	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sol G	ND	ND	12,3	33	ND	ND	ND	ND
Sol H	11,4§	10,7	6,8§	15	0,21§	16	6,7§	13
Sol SMR 2710	14,8§	4,2	7,9§	6	0,23§	8	7,5§	6
r^2	0,999		0,997		0,996		0,999	
ETR	48		41		1,4		33	
CV(%)	7,5		11,8		1,7		7,8	

§ montre une différence significative entre la pente déterminée pour le sol et celle obtenue pour la forme référence ($p<0,05$)
ETR : Ecart-type résiduel ; CV : Coefficient de variation ; ND : Non déterminée car valeurs inférieures à la limite de quantification dans le compartiment considéré

II.2.4) Les courbes dose-réponse pour l'antimoine

Au contraire des trois autres contaminants, seules les données obtenues dans l'urine permettent de tracer la courbe dose-réponse pour la forme de référence de l'antimoine sur la totalité de la gamme d'exposition utilisée (0 à 300 µgSb/kgPV/jour). En effet, la concentration en antimoine dans les reins est inférieure à la limite de quantification pour la dose d'exposition la plus faible pour la forme de référence. Pour le foie et l'os, les concentrations en antimoine sont inférieures aux limites de quantification respectives de chacun de ces compartiments pour les deux premières doses d'exposition. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus dans le cadre de l'étude préliminaire sur l'exposition de l'antimoine (Caboche *et al.*, 2009). En effet, cette étude avait mis en évidence que l'urine était le compartiment le plus sensible à l'exposition de l'antimoine notamment pour les doses d'exposition inférieure à 200 µgSb/kgPV/jour ce qui est le cas pour la majorité des doses administrées.

Les réponses de l'antimoine dans les compartiments cibles sont significativement linéaires ($p < 0,05$) pour la forme de référence et pour l'ensemble des sols contaminés dont les courbes dose-réponse ont pu être établies. Les figures 17 et 18 illustrent des exemples de courbes dose-réponse obtenues via l'urine. Les courbes dose-réponse sont tracées sur deux figures différentes pour avoir une meilleure représentation des données étant donné que les sols 1 et 2 sont fortement concentrés en antimoine. Au contraire des résultats obtenus pour les trois autres contaminants, ceux présentés sur les figures 17 et 18 montrent qu'il n'y a apparemment pas de différences entre les réponses (pentes similaires) en fonction des sols contaminés.

Le tableau 17 résume les valeurs des pentes des courbes dose-réponse. Pour les reins, l'os et le foie, les courbes dose-réponse n'ont pu être obtenues seulement que pour les deux sols les plus contaminés en antimoine (sols 1 et 2). Pour les autres sols, les données obtenues au sein de ces trois compartiments sont en-dessous des limites de quantification (10 µg/kg MS pour le foie ; 10 µg/kg MS pour les reins ; 0,02 µg/g de cendres pour l'os). L'urine est donc le meilleur compartiment cible pour l'estimation de la biodisponibilité relative l'antimoine.

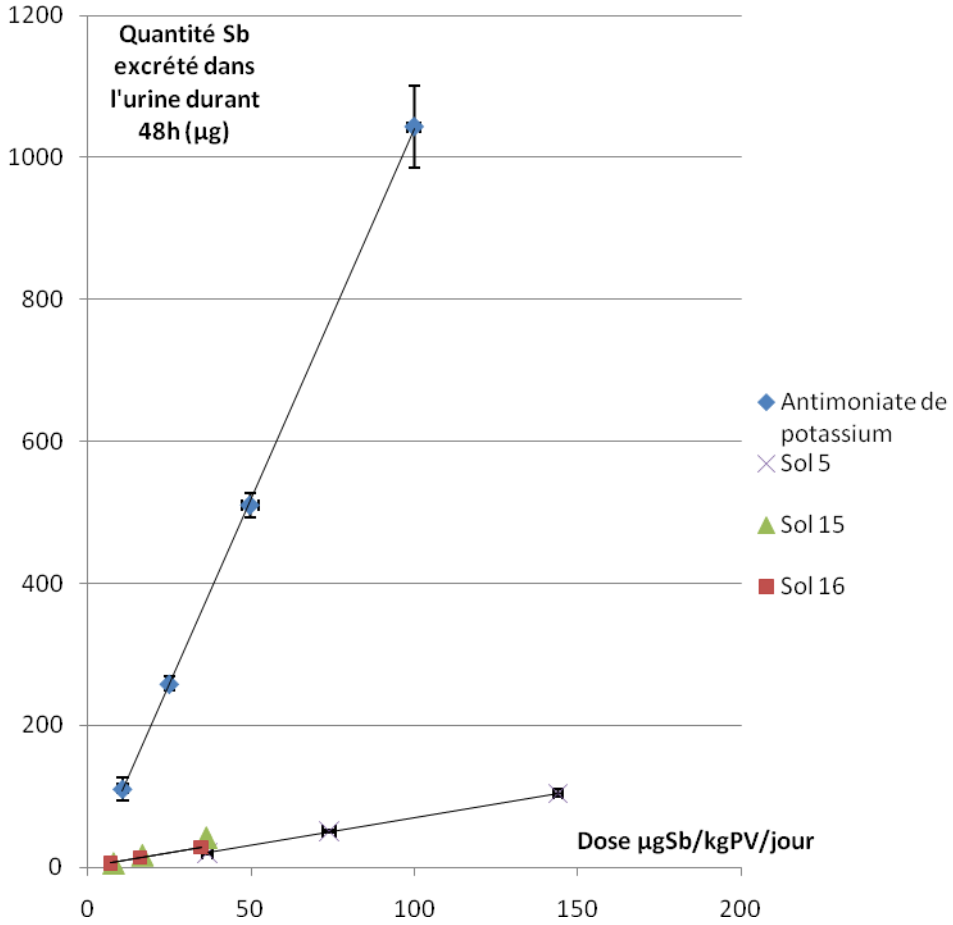


Figure 17 : Exemple de courbes dose-réponse obtenues pour trois sols et pour l'antimoniate de potassium dans l'urine (Moyenne ± écart-type, n=3)

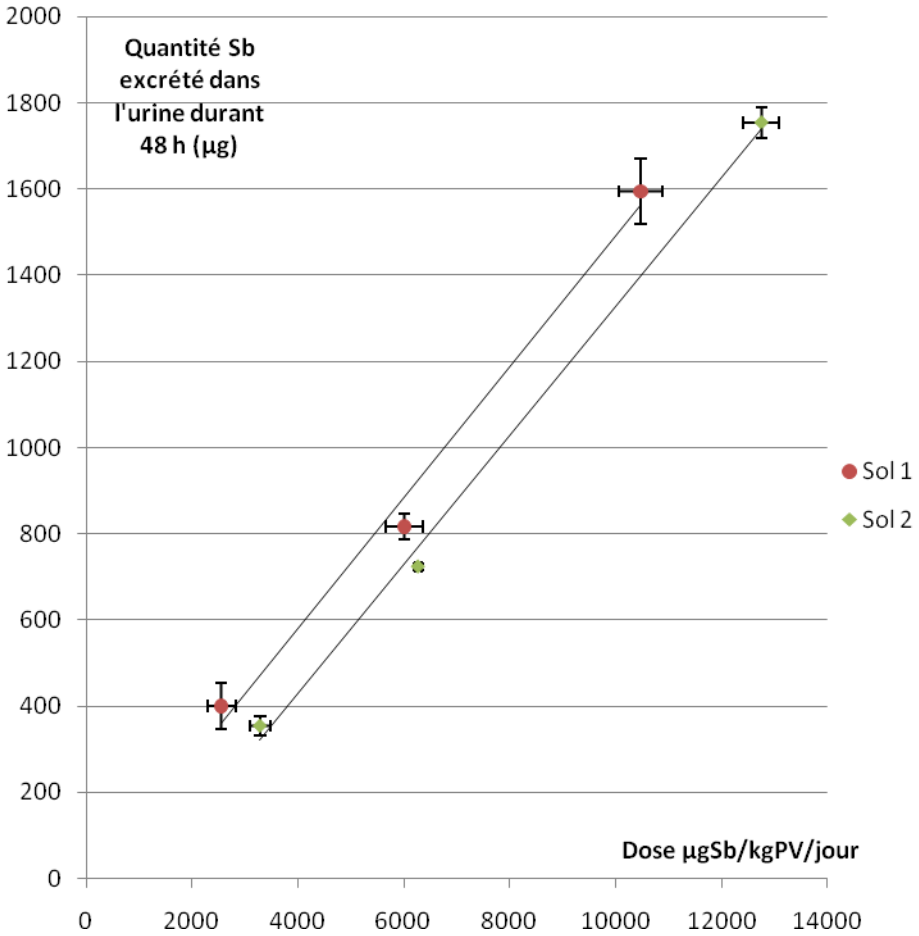


Figure 18 : Exemple de courbes dose-réponse obtenues dans l'urine pour les deux sols les plus fortement contaminés en antimoine (Moyenne ± écart-type, n=3)

Cependant, en raison du faible taux d'absorption (5% à 10%) de l'antimoine (ATSDR, 1992), des faibles concentrations en antimoine et probablement de sa faible biodisponibilité dans la matrice sol, les courbes dose-réponse n'ont pas pu être obtenues, même dans l'urine, pour les sols 4, F, G et le matériau de référence SMR 2710. Les résultats obtenus pour l'urine montrent que les pentes déterminées pour chaque sol sont significativement différentes de la pente obtenue pour la forme de référence ($p<0,05$) mais les incertitudes sont importantes et varient de 23% à 87%. Toutes les pentes obtenues sont très faibles par rapport à celle de la forme de référence, ce qui laisse présager une faible biodisponibilité relative de l'antimoine pour l'ensemble des sols testés.

Tableau 17 : Estimation des pentes des courbes dose-réponse obtenues pour l'antimoine au sein de chacun des compartiments cibles

	Rein		Urine		Os		Foie	
	Pente	Erreur standard pente	Pente	Erreur standard pente	Pente	Erreur standard pente	Pente	Erreur standard pente
Antimoniate de potassium	$3{,}4.10^{-1}$	23	11,43	0,9	$2{,}6.10^{-2}$	15	$1{,}86.10^{-1}$	37
Sol 1	$1{,}02.10^{-3}$§	49	0,15§	34	$2{,}6.10^{-4}$§	38	$5{,}6.10^{-3}$§	27
Sol 2	$1{,}36.10^{-3}$§	44	0,17§	51	$5{,}6.10^{-4}$§	47	$7{,}4.10^{-3}$§	33
Sol 4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sol 5	ND	ND	0,78§	64	ND	ND	ND	ND
Sol 7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sol 10	ND	ND	1,06§	66	ND	ND	ND	ND
Sol 14	ND	ND	0,63§	23	ND	ND	ND	ND
Sol 15	ND	ND	1,26§	87	ND	ND	ND	ND
Sol 16	ND	ND	0,8§	50	ND	ND	ND	ND
Sol A	ND	ND	1,15§	66	ND	ND	ND	ND
Sol C	ND	ND	1,21§	54	ND	ND	ND	ND
Sol D	ND	ND	0,56§	71	ND	ND	ND	ND
Sol F	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sol G	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sol H	ND	ND	1,03§	65	ND	ND	ND	ND
Sol SMR 2710	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
r^2	0,997		0,998		0,996		0,995	
ETR	31		40,5		2,6		15	
CV(%)	16		13		23		21	

§ montre une différence significative entre la pente déterminée pour le sol et celle obtenue pour la forme référence ($p<0{,}05$)

ETR : Ecart-type résiduel ; CV : Coefficient de variation ; ND : Non déterminée car données inférieures à la limite de quantification dans le compartiment considéré

II.3) Biodisponibilité relative des ETM dans les sols

La biodisponibilité relative est déterminée par le ratio des pentes pour un sol donné et la forme de référence du contaminant considéré. Pour chacun des contaminants, elle a été déterminée pour les sols dont les courbes dose-réponse ont été obtenues et pour les sols dont la pente de la courbe dose-réponse est significativement différente de celle de la forme de référence. D'un point de vue méthodologique, si les pentes ne sont pas significativement différentes, la biodisponibilité relative est assimilée à 100% et cette valeur a été reportée dans les tableaux. Par exemple, pour le plomb à partir des données obtenues dans le rein, pour le sol G la valeur de 76% (intervalle de confiance de 64% à 88%) est assimilée à 100% étant donné que l'analyse statistique montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les pentes (Tableau 14 et 18). Cependant, comme cette valeur est établie par défaut, elle ne sera pas utilisée dans l'étude de la corrélation entre biodisponibilité relative et bioaccessibilité relative.

II.3.1) Détermination de la biodisponibilité relative du plomb dans les sols

Le tableau 18 regroupe les valeurs de biodisponibilité relative du plomb dans les 16 sols pour chaque compartiment cible. Premièrement, les résultats répondent à notre attente d'obtenir une large gamme de valeurs de biodisponibilité relative dans les sols. En se basant sur les sols dont la biodisponibilité relative a pu être calculée, celle-ci varie de 6% à 76%, de 8% à 82%, de 6% à 77% et de 10 à 82% d'après les estimations réalisées sur le rein, l'urine, l'os et le foie, respectivement. Pour un même sol, les valeurs de biodisponibilité relative estimées au sein des quatre compartiments cibles sont très proches.

Pour chaque sol et chaque compartiment, un intervalle de confiance de la valeur de biodisponibilité relative a été estimé. Ce dernier est beaucoup plus élevé pour les sols qui présentent des concentrations faibles en plomb et dont l'erreur standard sur la pente était élevée. De manière générale pour l'ensemble des compartiments cibles et des sols, l'incertitude sur l'estimation de la biodisponibilité relative varie de 7% à 20%.

Tableau 18 : Estimation de la biodisponibilité relative du plomb dans les 16 sols contaminés et au sein des quatre compartiments cibles

		Rein			**Urine**			**Os**			**Foie**		
		BR (%)	IC(5%)	IC(95%)	**BR (%)**	IC(5%)	IC(95%)	**BR (%)**	IC(5%)	IC(95%)	**BR (%)**	IC(5%)	IC(95%)
Sols Miniers	Sol 1	**6**	2	10	**8**	4	12	**9**	5	11	**10**	6	14
	Sol 2	**7**	4	10	**10**	7	13	**6**	2	10	**10**	7	13
	Sol 4	**21**	19	23	**20**	18	22	**12**	7	17	**18**	15	21
	Sol 5	**25**	23	27	**32**	30	34	**34**	32	36	**28**	26	30
	Sol 7	**33**	27	39	**34**	27	41	**37**	32	42	**37**	33	41
	Sol 10	**22**	16	28	**31**	25	37	**31**	27	35	**23**	19	27
	Sol 14	**50**	48	52	**45**	43	47	**52**	50	54	**40**	38	42
	Sol 15	**57**	54	60	**59**	57	61	**60**	59	62	**ND**	-	-
	Sol 16	**62**	60	64	**54**	52	56	**55**	53	57	**ND**	-	-
Sols de Fonderie	Sol A	**31**	28	34	**28**	26	30	**41**	39	43	**29**	27	31
	Sol C	**46**	43	49	**39**	33	45	**42**	38	46	**30**	26	34
	Sol D	**51**	47	55	**56**	53	59	**45**	42	48	**38**	35	41
	Sol F	**75**	62	88	**100**	-	-	**100**	-	-	**80**	70	90
	Sol G	**100**$^{\Omega}$	-	-	**100**	-	-	**100**	-	-	**78**	66	80
	Sol H	**100**	-	-	**100**	-	-	**100**	-	-	**85**	77	93
	Sol SMR 2710	**76**	73	79	**82**	78	86	**77**	73	81	**82**	78	87

BR : Biodisponibilité Relative, IC : Intervalle de confiance à 95%
ND : Biodisponibilité Relative non déterminée car modèle non linéaire
Ω: La valeur 100% est indiquée lorsque la pente obtenue pour le sol est non significativement différente de la pente de la forme de référence (p>0,05)

Donc, pour l'ensemble des sols utilisés, l'incertitude peut être considérée comme satisfaisante pour des données *in vivo*. A titre de comparaison, pour 19 sols étudiés par l'USEPA, la biodisponibilité du plomb variait de 1 à 105% (Casteel *et al.*, 2006 ; USEPA, 2007b*)* et l'incertitude sur les valeurs de biodisponibilité relative obtenues pour le rein variait de 10% à 36%.

La biodisponibilité relative du plomb pour les sols échantillonnés sur les sites miniers (24%) est significativement plus faible que la biodisponibilité relative obtenue pour les sols contaminés par les dépôts atmosphériques de l'ancienne fonderie (54%) (Test U, $\alpha = 5\%$). Cependant, au sein d'un même site, la biodisponibilité relative peut être très différente d'un sol à l'autre : ainsi, pour le site minier, le plomb contenu dans le sol 16 présente une biodisponibilité relative 10 fois supérieure à celui contenu dans le sol 1.

II.3.2) Détermination de la biodisponibilité relative du cadmium dans les sols

Le tableau 19 résume l'ensemble des valeurs de biodisponibilité relative du cadmium dans les 16 sols déterminées dans chaque compartiment cible. En raison des faibles concentrations en cadmium dans plusieurs sols, la biodisponibilité relative de ce contaminant n'a pu être déterminée que pour 10 sols, et ce à partir des données obtenues dans le rein. Cependant, pour un sol donné, lorsque la biodisponibilité relative a été déterminée au sein des quatre compartiments cibles, les valeurs sont très proches. Sur la totalité des valeurs, une large gamme, variant entre 9% et 89% a néanmoins été obtenue. Dans le cadre de l'étude de Schroder *et al.* (2003), la biodisponibilité relative du cadmium varie de 10% à 116% au sein de 10 sols miniers et de fonderie présentant des concentrations totales en cadmium similaires à celles utilisées au cours de l'étude (24 $mg.kg^{-1}$ à 465 $mg.kg^{-1}$). Le tableau 19 présente également l'intervalle de confiance associé à chacune des valeurs de biodisponibilité relative. Comme pour le plomb, l'incertitude sur la valeur de biodisponibilité relative augmente lorsque la concentration en cadmium biodisponible est plus faible.

Tableau 19 : Estimation de la biodisponibilité relative du cadmium dans les 16 sols contaminés et au sein des quatre compartiments cibles

		Rein			Urine			Os			Foie		
		BR (%)	IC(5%)	IC(95%)	**BR (%)**	IC(5%)	IC(95%)	**BR (%)**	IC(5%)	IC(95%)	**BR (%)**	IC(5%)	IC(95%)
Sols Miniers	Sol 1	**ND**	-	-	**ND**	-	-	**ND**	-	-	**ND**	-	-
	Sol 2	**9**	3	15	**15**	10	20	**12**	6	18	**12**	6	18
	Sol 4	**48**	43	53	**44**	36	52	**39**	35	43	**48**	42	54
	Sol 5	**ND**	-	-	**ND**	-	-	**ND**	-	-	**ND**	-	-
	Sol 7	**36**	30	42	**ND**	-	-	**27**	22	32	**ND**	-	-
	Sol 10	**55**	51	59	**62**	55	69	**62**	55	69	**51**	45	57
	Sol 14	**17**	9	25	**ND**	-	-	**ND**	-	-	**ND**	-	-
	Sol 15	**49**	45	53	**55**	50	60	**45**	37	53	**43**	36	50
	Sol 16	**38**	31	45	**35**	29	41	**36**	29	43	**41**	33	49
Sols de Fonderie	Sol A	**ND**	-	-	**ND**	-	-	**ND**	-	-	**ND**	-	-
	Sol C	**89**	71	107	**ND**	-	-	**ND**	-	-	**ND**	-	-
	Sol D	**ND**	-	-	**ND**	-	-	**ND**	-	-	**ND**	-	-
	Sol F	**80**	61	99	**ND**	-	-	**75**	53	97	**ND**	-	-
	Sol G	**ND**	-	-	**ND**	-	-	**ND**	-	-	**ND**	-	-
	Sol H	**74**	71	77	**76**	73	79	**82**	79	85	**75**	73	77
	Sol SMR 2710	**ND**	-	-	**ND**	-	-	**ND**	-	-	**ND**	-	-

BR : Biodisponibilité Relative, IC : Intervalle de confiance
ND : Biodisponibilité relative non déterminée car pas de réponses obtenues pour les sols (valeurs inférieures aux LQ de chaque compartiment cible)

C'est le cas par exemple du sol F où la concentration en cadmium est l'une des plus faibles (30 $mg.kg^{-1}$) ou encore le sol 2 qui présente une concentration totale en cadmium importante (150 $mg.kg^{-1}$) mais une faible biodisponibilité relative (9%). De manière générale, dans le cadre de l'étude, en-deçà d'un sol présentant une concentration en cadmium biodisponible inférieure à 20 $mg.kg^{-1}$ l'incertitude augmente fortement (incertitude supérieure à 20%).
Finalement, même si les valeurs sont les plus élevées sur les sols prélevés à proximité de la fonderie, la comparaison des biodisponibilités relatives moyennes du cadmium entre les deux historiques de contamination est difficile à réaliser car à proximité de l'ancienne fonderie, seules les valeurs de 3 sols ont pu être mesurées. C'est néanmoins, pour ces trois sols, que les valeurs de biodisponibilité relative du cadmium les plus importantes sont obtenues (74, 80 et 89%). Pour les sols du site minier, la biodisponibilité relative semble plus faible (36% pour le rein) mais également plus variable en fonction des sols (9 à 55%, pour le rein).

II.3.3) Détermination de la biodisponibilité relative de l'arsenic dans les sols

Le tableau 20 résume l'ensemble des valeurs de biodisponibilité relative de l'arsenic déterminées dans chaque compartiment cible. La biodisponibilité relative de l'arsenic n'a pas pu être obtenue pour les 16 sols. En raison, de la faible concentration en arsenic et probablement de sa faible biodisponibilité, celle-ci n'a pas pu être quantifiée pour les sols 7, F et G. La biodisponibilité relative varie néanmoins sur une large gamme de valeurs de 2% à 66% dans le rein, de 3% à 72% l'urine, de 3% à 59% dans l'os et de 3 à 71% dans le foie. Comme pour les deux éléments précédents, pour un même sol, les valeurs de biodisponibilité relative sont proches entre les quatre compartiments cibles. De même, les incertitudes sur les valeurs de biodisponibilité relative sont dépendantes de la concentration en arsenic biodisponible. En effet, pour le sol A par exemple, en raison de la faible concentration en arsenic (21 $mg.kg^{-1}$) l'incertitude sur l'estimation de la biodisponibilité relative est importante (56% ± 40).
Finalement, en moyenne la biodisponibilité relative de l'arsenic pour les sols échantillonnés sur les sites miniers (7%) est significativement plus faible que la biodisponibilité relative obtenue pour les sols impactés par les dépôts atmosphériques de l'ancienne fonderie (51%) (Test *U*, $\alpha = 5\%$).

Tableau 20 : Estimation de la biodisponibilité relative de l'arsenic dans les 16 sols contaminés et au sein des quatre compartiments cibles

		Rein			Urine			Os			Foie		
		BR (%)	IC(5%)	IC(95%)	**BR (%)**	IC(5%)	IC(95%)	**BR (%)**	IC(5%)	IC(95%)	**BR (%)**	IC(5%)	IC(95%)
Sols Miniers	Sol 1	**2**	0,5	3,5	**3**	0,5	5,5	**5**	3	7	**4**	2	6
	Sol 2	**3**	1	5	**3**	1	5	**3**	1	5	**4**	2	6
	Sol 4	**17**	10	24	**12**	0,5	23,5	**14**	4	24	**11**	2	20
	Sol 5	**2**	0,2	3,8	**4**	0,6	7,4	**3**	0,4	5,6	**3**	0,3	5,7
	Sol 7	**ND**	-	-	**ND**	-	-	**ND**	-	-	**ND**	-	-
	Sol 10	**9**	5	13	**12**	7	17	**10**	5	15	**11**	7	15
	Sol 14	**5**	1	9	**5**	1	9	**4**	1	7	**5**	1	9
	Sol 15	**8**	5	11	**7**	3	11	**7**	4	10	**6**	3	9
	Sol 16	**11**	7	15	**15**	10	20	**7**	3	11	**10**	6	14
Sols de Fonderie	Sol A	**ND**	-	-	**56**	16	96	**59**	19	99	**ND**	-	-
	Sol C	**66**	59	73	**72**	60	84	**100**	-	-	**71**	63	78
	Sol D	**ND**	-	-	**35**	20	50	**36**	14	58	**30**	19	41
	Sol F	**ND**	-	-	**ND**	-	-	**ND**	-	-	**ND**	-	-
	Sol G	**ND**	-	-	**100** Ω	-	-	**ND**	-	-	**ND**	-	-
	Sol H	**39**	34	44	**42**	36	48	**51**	40	62	**40**	34	46
	Sol SMR 2710	**50**	47	53	**49**	46	52	**54**	51	57	**45**	43	47

BR : Biodisponibilité Relative, IC : Intervalle de confiance
ND : Biodisponibilité relative non déterminée car pas de réponses obtenues pour les sols (valeurs inférieures aux LQ de chaque compartiment cible)
Ω: La valeur 100% est indiquée lorsque la pente obtenue pour le sol est non significativement différente de la pente de la forme de référence (p> 0,05)

Pour les sols de fonderie, il n'y a que deux sols dont la biodisponibilité relative est supérieure à 50%. Pour les sols miniers, contrairement au plomb, l'amplitude de variation de la biodisponibilité de l'arsenic est très faible. En effet, aucune valeur de biodisponibilité relative n'excède 13%. De manière générale, ces résultats indiquent que la variation de la biodisponibilité relative de l'arsenic dans les sols est plus faible que celle obtenue pour le plomb ou le cadmium. Ces résultats sont cohérents avec ceux de l'étude menée par l'USEPA (2005) qui détermine également la biodisponibilité relative de l'arsenic chez le porcelet via l'excrétion urinaire. En effet, cette étude montre que la biodisponibilité relative de l'arsenic dans 26 sols varie de 8% à 57%. De même, Juhasz *et al.* (2007b) montrent que la biodisponibilité relative de l'arsenic varie de 11,2% à 75% et que les valeurs les plus faibles sont obtenues pour les sols de nature géochimique (de 11,2 à 14%).

II.3.4) Détermination de la biodisponibilité relative de l'antimoine dans les sols

Le tableau 21 résume l'ensemble des valeurs de biodisponibilité relative de l'antimoine déterminée principalement par les données obtenues via l'urine. En raison, de la faible concentration en antimoine et sa faible biodisponibilité, celle-ci n'a pas pu être quantifiée pour les sols 4, 7, F, G et le sol de référence SMR 2710. Pour les 11 sols dans lesquels la biodisponibilité relative de l'antimoine a pu être estimée, celle-ci demeure très faible : comprise entre 1% et 11%. Du fait de la faible concentration en antimoine dans les sols et de la faible biodisponibilité relative, l'incertitude sur les valeurs est relativement élevée pour la majorité des sols (Tableau 21).

Contrairement aux trois autres contaminants, il n'y a pas de différence significative de biodisponibilité entre les deux historiques de contamination ou entre les sols ayant subi le même historique. La biodisponibilité relative de l'antimoine est faible, inférieure à 11%, quels que soient les sols étudiés. A notre connaissance, dans la littérature, il n'y a aucune donnée de biodisponibilité de l'antimoine suite à l'ingestion de terre qui pourrait confirmer la faible variation de la biodisponibilité pour ce contaminant.

Tableau 21 : Estimation de la biodisponibilité relative de l'antimoine dans les 16 sols contaminés et au sein des quatre compartiments cibles

		Rein			Urine			Os			Foie		
		BR (%)	IC(5%)	IC(95%)	**BR (%)**	IC(5%)	IC(95%)	**BR (%)**	IC(5%)	IC(95%)	**BR (%)**	IC(5%)	IC(95%)
Sols Miniers	Sol 1	**3**	1	5	**1**	0,2	1,8	**4**	2	6	**3**	1	5
	Sol 2	**4**	1,5	6,5	**2**	0,8	3,2	**2**	0,6	3,4	**4**	2	6
	Sol 4	**ND**	-	-	**ND**	-	-	**ND**	-	-	**ND**	-	-
	Sol 5	**ND**	-	-	**7**	2,6	11,4	**ND**	-	-	**ND**	-	-
	Sol 7	**ND**	-	-	**ND**	-	-	**ND**	-	-	**ND**	-	-
	Sol 10	**ND**	-	-	**9**	3	15	**ND**	-	-	**ND**	-	-
	Sol 14	**ND**	-	-	**6**	3,8	8,2	**ND**	-	-	**ND**	-	-
	Sol 15	**ND**	-	-	**11**	1,1	20,9	**ND**	-	-	**ND**	-	-
	Sol 16	**ND**	-	-	**7**	2,8	11,2	**ND**	-	-	**ND**	-	-
Sols de Fonderie	Sol A	**ND**	-	-	**10**	4,3	15,7	**ND**	-	-	**ND**	-	-
	Sol C	**ND**	-	-	**11**	5,6	16,4	**ND**	-	-	**ND**	-	-
	Sol D	**ND**	-	-	**5**	2,2	7,8	**ND**	-	-	**ND**	-	-
	Sol F	**ND**	-	-	**ND**	-	-	**ND**	-	-	**ND**	-	-
	Sol G	**ND**	-	-	**ND**	-	-	**ND**	-	-	**ND**	-	-
	Sol H	**ND**	-	-	**9**	2,9	15,1	**ND**	-	-	**ND**	-	-
	Sol SMR 2710	**ND**	-	-	**ND**	-	-	**ND**	-	-	**ND**	-	-

BR : Biodisponibilité Relative, IC : Intervalle de confiance à 95%
ND : Biodisponibilité relative non déterminée car pas de réponses obtenues pour les sols (valeurs inférieures aux LQ de chaque compartiment cible)

II.4) Choix des compartiments cibles qui seront utilisés dans les études de corrélation

Les résultats obtenus montrent, mis à part pour l'antimoine, que la biodisponibilité relative a pu être estimée au sein des quatre compartiments cibles. Dans l'optique d'établir les corrélations *in vivo/in vitro* se pose la question suivante : quelles valeurs de biodisponibilité choisir pour étudier ces corrélations ?

Dans les études de l'USEPA (Casteel *et al.*, 2006 ; USEPA, 2007b) la biodisponibilité du plomb est également déterminée au sein de différents compartiments cibles (reins, foie, os, sang). Dans ces études, la démarche est de réaliser la moyenne des biodisponibilités relatives obtenues pour les quatre compartiments cibles. En effet, Casteel *et al.* (2006) montrent que statistiquement l'estimation de la biodisponibilité relative du plomb dans chacun des compartiments cibles n'est pas significativement différentes. Les résultats de l'étude montrent également que l'estimation de la biodisponibilité relative, pour un sol donné, est cohérente lorsque celle-ci a pu être estimée au sein des quatre compartiments cibles. Ainsi, pour le plomb notamment, il pourrait être envisagé de calculer une biodisponibilité moyenne qui pourrait être utilisée ensuite pour les études de corrélation.

Toutefois d'un point de vue biologique ce raisonnement ne nous apparaît pas pertinent. En effet, les résultats de notre étude montrent que la réponse est spécifique à chaque organe cible. Pour le plomb, par exemple, la réponse dans le foie n'est pas linéaire sur la totalité de la gamme d'exposition pour la forme de référence. De même, pour des sols fortement contaminés et des formes de plomb biodisponibles (sol 15 et 16), les réponses dans le foie ne sont pas linéaires. Ainsi, pour déterminer la biodisponibilité relative pour une large gamme de sol, il est préférable d'utiliser le rein, l'os ou l'urine. De plus, au-delà de la non linéarité de la réponse sur la totalité de la gamme d'exposition pour le foie, en fonction de la sensibilité de la réponse au sein de chaque compartiment cible, la biodisponibilité relative du plomb a été déterminée pour un nombre de sols différents (fonction de la linéarité et significativité des pentes). Par conséquent, la démarche qui consiste à effectuer la moyenne entre les contaminants n'apparaît pas judicieuse étant donné que les données obtenues pour la biodisponibilité relative sont liées à la sensibilité des réponses au sein de chacun des organes cibles. Pour les autres contaminants étudiés, notamment l'antimoine, cette spécificité et sensibilité entre les organes cibles pour déterminer la biodisponibilité relative est encore plus importante. En effet, les résultats montrent bien que pour déterminer la biodisponibilité de

l'antimoine, l'urine est le compartiment cible à utiliser. Dans le cadre de notre étude, il a été choisi de définir le meilleur organe cible pour estimer la biodisponibilité relative d'un contaminant donné. Dans les études *in vivo*, le choix du meilleur organe cible est généralement basé sur la meilleure réponse biologique (linéarité sur toute la gamme d'exposition, faible coefficient de variation et r^2 élevé). Dans cette optique, les tableaux 22 à 25 regroupent les caractéristiques de chacun des modèles développés pour les différents éléments traces métalliques. Ainsi, en se basant sur ces valeurs, il est difficile de définir le meilleur organe cible étant donné que, pour l'ensemble des compartiments cibles, le coefficient de détermination est supérieur à 0,99 et que les valeurs de coefficient de variation sont, dans la majorité des cas, très proches les unes des autres pour un contaminant donné. De ce fait, un critère supplémentaire à prendre en compte dans l'optique de valider le test *in vitro*, est que le compartiment cible doit permettre l'estimation de la biodisponibilité relative pour le plus grand nombre de sol afin d'obtenir, par la suite, une corrélation la plus robuste possible entre biodisponibilité relative et bioaccessibilité relative.

- Pour le plomb, les quatre compartiments pourraient être utilisés. Cependant, le rein a été choisi comme organe cible étant donné que les réponses sont linéaires sur la totalité de la gamme d'exposition, au contraire du foie, et que les données obtenues via ce compartiment permettent d'estimer la biodisponibilité du plomb dans 14 sols.

- Pour le cadmium, le rein sera utilisé comme compartiment cible. Ces observations sont cohérentes avec les études toxicocinétiques qui montrent que le cadmium absorbé est principalement accumulé dans le rein (EPA, 1999 ; ATSDR, 2008). De plus, la seule étude de biodisponibilité relative du cadmium dans les sols utilise également le rein comme organe cible (Schroder *et al.*, 2003).

- Pour l'arsenic, les données obtenues pour l'urine seront utilisées dans les études de corrélation. Ceci est cohérent avec les observations toxicocinétiques réalisées dans le chapitre I qui ont montré que l'arsenic est majoritairement excrété via l'urine. De plus, la majorité des études de biodisponibilité relative de l'arsenic utilise l'urine comme compartiment cible (Roberts *et al.*, 2002 ; USEPA, 2003, 2005, Roberts *et al.*, 2006).

- En se basant sur le Tableau 25, il est évident que pour l'antimoine, les données obtenues pour l'urine seront utilisées pour corréler la biodisponibilité relative à la bioaccessibilité relative.

Tableau 22 : Résumé des caractéristiques des modèles obtenus pour le plomb au sein de chaque compartiment cible et nombre de sols pour lequel la biodisponibilité relative du plomb a pu être calculée.

	CV (%)	r^2	Nombre de sols[£]
Rein	5,8	0,999	14
Urine	7	0,998	13
Os	6	0,998	13
Foie	7	0,996	14

[£] *Les sols dont les valeurs de biodisponibilité relative sont de 100% ne sont pas considérés*

Tableau 23 : Résumé des caractéristiques des modèles obtenus pour l'arsenic au sein de chaque compartiment cible et le nombre de sols pour lequel la biodisponibilité relative de l'arsenic a pu être calculée.

	CV(%)	r^2	Nombre de sols
Rein	7,5	0,999	11
Urine	11,8	0,997	13
Os	1,7	0,996	10
Foie	7,8	0,999	11

Tableau 24 : Résumé des caractéristiques des modèles obtenus pour le cadmium au sein de chaque compartiment cible et le nombre de sol pour lequel la biodisponibilité relative du cadmium a pu être calculée.

	CV (%)	r^2	Nombre de sols
Rein	6,7	0,999	10
Urine	29	0,998	6
Os	10,5	0,998	8
Foie	8,4	0,996	6

Tableau 25: Résumé des caractéristiques des modèles obtenus pour l'antimoine au sein de chaque compartiment cible et le nombre de sols pour lequel la biodisponibilité relative de l'antimoine a pu être calculée.

	CV (%)	r^2	Nombre de sols
Rein	16	0,997	2
Urine	13	0,998	11
Os	23	0,996	2
Foie	21	0,995	2

III.) Conclusion

L'objectif de l'étude était d'utiliser un modèle *in vivo* et de développer une démarche permettant d'estimer la biodisponibilité relative de quatre éléments traces métalliques (Pb, Cd, As et Sb) suite à l'ingestion de terre présentant des caractéristiques contrastées. Dans la littérature, différents modèles animaux ont été utilisés en vue d'estimer la biodisponibilité des éléments métalliques dans les sols en fonction des contaminants étudiés (porc, rat, singe). Dans le cadre de l'étude, un animal unique, le porcelet, a été utilisé comme modèle humain et a permis l'estimation de la biodisponibilité du plomb, du cadmium, de l'arsenic et de l'antimoine pour des gammes de doses d'exposition, donc des concentrations en contaminants dans les sols, très larges. Par contre, l'étude montre qu'il est nécessaire d'avoir une approche multi-compartiments afin d'estimer au mieux la biodisponibilité relative des quatre contaminants. La difficulté de l'étude, résidait dans la détermination de la biodisponibilité des quatre contaminants au sein de la même expérience *in vivo*. L'inconvénient de la démarche utilisée est qu'en fonction des concentrations totales en contaminants dans chacun des sols, les doses d'exposition étaient plus ou moins faibles. Ainsi, en fonction des doses d'exposition et de la biodisponibilité des contaminants, celle-ci n'a pas pu être déterminée pour l'ensemble des échantillons. De plus, pour le cadmium, l'arsenic et l'antimoine, des incertitudes importantes sur l'estimation de la biodisponibilité relative sont obtenues pour quelques sols. Pour ces sols, les incertitudes pourraient être diminuées à l'avenir en modifiant légèrement l'approche expérimentale. Par exemple, il suffirait d'augmenter, pour les sols faiblement contaminés, la quantité de sol à ingérer ou alors réaliser une quatrième dose d'exposition.

Les résultats obtenus confirment a posteriori la pertinence du choix des formes de référence. En effet, l'absorption des éléments en provenance de ces formes était systématiquement supérieure aux sols. Les résultats obtenus confirment également qu'il n'y a qu'une fraction de chaque contaminant qui est biodisponible comparativement à chaque forme de référence. Finalement, les résultats confortent le choix des sols utilisés. En effet, dans l'optique de corréler biodisponibilité et bioaccessibilité, l'objectif était d'avoir une large gamme de valeurs et des sols présentant des caractéristiques physico-chimiques contrastées afin d'obtenir une corrélation robuste (McGeer *et al.*, 2006 ; Drexler *et al.*, 2007). Le choix des sols a permis d'obtenir des valeurs de biodisponibilité relative couvrant de 70 à 90% de la gamme possible pour le plomb, le cadmium et l'arsenic. Cet objectif n'est pas atteint pour l'antimoine. En effet, les valeurs de biodisponibilité relative sont toutes inférieures à 11%.

Chapitre 4

Estimation de la bioaccessibilité des contaminants métalliques dans 15 sols contaminés par l'utilisation du test *in vitro* unifié BARGE

Pour se soustraire des contraintes associées aux études *in vivo* (longues et coûteuses) de nombreux modèles de digestion *in vitro* basés ou non sur la physiologie humaine ont été développés. Ces tests sont des outils alternatifs, simples (par rapport à des mesures *in vivo*), peu coûteux et rapides pour estimer la biodisponibilité des polluants dans le sol via la bioaccessibilité (Ruby *et al.*, 1996 ; Oomen *et al.*, 2002 ; Wragg et Cave, 2002 ; Schroder *et al.*, 2004 ; Oomen *et al.*, 2006). Cependant, la diversité des tests *in vitro*, le manque d'uniformité dans les paramètres de chacun de ces tests et l'absence de validation par des données *in vivo* pour la majorité d'entre eux, font qu'actuellement il n'y a pas un protocole unique d'estimation de la bioaccessibilité. Ces différentes contraintes n'incitent pas, pour le moment, à l'application du concept de bioaccessibilité en évaluation des risques.

Pour ces différentes raisons, le groupe BARGE a décidé de développer un test *in vitro* de bioaccessibilité indiquant les paramètres par défaut à utiliser pour être représentatif de la physiologie du tractus gastro-intestinal de l'enfant afin d'uniformiser la mesure de la bioaccessibilité. Ainsi, il nous a semblé intéressant de partir du test UBM en raison de l'effort de consensus large pour l'élaboration d'un test unique. L'objectif premier de ce chapitre est, par l'application du protocole UBM, de mesurer la bioaccessibilité des 4 éléments métalliques pour les 15 sols choisis, et, d'obtenir une base de valeurs qui servira aux corrélations qui seront détaillées dans le chapitre 5. Au cours de ce chapitre, le second objectif sera de comprendre par le biais de différents paramètres (physico-chimiques et distribution sur les phases porteuses) les facteurs influençant la bioaccessibilité des ETM dans les sols.

I.) Matériels et méthodes

I.1) Le test *in vitro* BARGE unifié (UBM)

I.1.1) Origine et développement du test in vitro UBM

Le test *in vitro* UBM a été développé, en 2005, par les différents membres du groupe européen BARGE, dans l'optique d'obtenir un test *in vitro* uniformisé en fixant chacun des paramètres du test les plus représentatifs de la réalité physiologique d'un enfant de 0 à 6 ans. La démarche et le développement du test unifié UBM reposent sur plusieurs principes :

- Il doit être **basé sur la physiologie de l'enfant (0-6 ans)**, mimant l'environnement physico-chimique du tractus gastro-intestinal **dans l'estomac et l'intestin grêle ;**
- Il doit représenter le **cas le plus conservatoire possible** afin de ne pas sous-estimer les niveaux de risques liés à l'ingestion de terre contaminé, d'où **le développement d'un test représentant les conditions d'un enfant à jeun** ;
- Il doit être **applicable pour l'ensemble des éléments traces métalliques**.

La méthode développée par le groupe BARGE est basée sur une méthode précédemment publiée et développée par le RIVM (Oomen, 2000 ; Oomen *et al.*, 2002 ; Oomen *et al.*, 2003a). Cette méthode a été considérée comme la plus représentative des conditions physiologiques dans le tractus gastro-intestinal de l'enfant (Oomen *et al.*, 2002). Cependant, quelques modifications ont été apportées à la méthode RIVM afin de s'assurer d'être dans le cas le plus conservatoire possible et que le test *in vitro* soit robuste et applicable à des sols aux caractéristiques variées (historique de contamination, propriétés physico-chimiques).

Tableau 26 : Composition des solutions digestives pour le test *in vitro* UBM

	Solution salivaire (pH = 6,5 ± 0,5)	**Solution gastrique (pH = 1,0 ± 0,2)**	**Solution duodénale (pH = 7,4 ± 0,2)**	**Solution biliaire (pH = 8,0 ± 0,2)**
Solution inorganique : masses indiquées pour 250 ml de solution	448 mg de KCl 444 mg NaH_2PO_4 100 mg KSCN 285 mg Na_2SO_4 149 mg NaCl 0,9 ml NaOH à 1 M	1376 mg de NaCl 133 mg de NaH_2PO_4 412 mg de KCl 200 mg de $CaCl_2$ 153 mg de NH_4Cl 4,15 ml HCl (37% g/g)	3506 mg de NaCl 2803 mg de $NaHCO_3$ 40 mg de KH_2PO_4 282 mg de KCl 25 mg de $MgCl_2$ 90 µl HCl (37% g/g)	2630 mg de NaCl 2893 mg de $NaHCO_3$ 188 mg de KCl 90 µl HCl (37% g/g)
Solution organique : masses indiquées pour 250 ml de solution	100 mg d'urée	325 mg de glucose 10 mg d'acide glucuronique 42,5 mg d'urée 165 mg d'hydrochloride de glucosamine	50 mg d'urée	125 mg d'urée
Réactifs à ajouter aux solutions inorganique et organique	72,5 mg d'alpha-amylase 25 mg de mucine 7,5 mg d'acide urique	500 mg de SAB* 1500 mg de mucine 500 mg de pepsine	100 mg de $CaCl_2$ 500 mg de SAB 1500 mg de pancréatine 250 mg de lipase	111 mg de $CaCl_2$ 900 mg de SAB 3000 mg de bile de porc

*SAB = Sérum Albumine de Bovin

I.1.2) Le protocole expérimental

Le test UBM repose sur des extractions successives à l'aide de solutions digestives synthétiques simulant les processus physiques et chimiques de la bouche, l'estomac et l'intestin grêle. Le protocole *in vitro* se déroule, par conséquent, en plusieurs étapes de préparation et d'extraction :

- *Préparation des solutions digestives :*

Les solutions sont préparées la veille de la réalisation du test *in vitro* UBM. La composition de chaque solution digestive est présentée dans le tableau 26. Pour chaque solution digestive, une solution « inorganique » puis une solution « organique » sont préparées dans des fioles jaugées de 250 ml dont le volume de chacune est ajusté par de l'eau milli-Q. Ensuite, après dissolution totale des composés, des réactifs (enzymes notamment) sont ajoutés à l'une ou l'autre des solutions précédemment préparées. Puis, les deux solutions (inorganique et organique) sont mélangées afin d'obtenir 500 ml de solution digestive. Finalement, les quatre solutions digestives obtenues sont mises en agitation, toute la nuit à température ambiante, à l'aide d'un agitateur magnétique. Les solutions digestives sont préparées à chaque fois qu'un test *in vitro* est réalisé. Le jour du test *in vitro* les fluides digestifs (préparés la veille) sont mis à chauffer à 37 ± 2 °C durant deux heures au moins avant leur utilisation. Le pH de chaque solution est mesuré, avant utilisation, et doit être dans chaque gamme indiquée dans le tableau 26. Dans le cas contraire, le pH des solutions est ajusté avec de l'acide chlorhydrique (37%) ou de la soude à 10 M.

- *Préparation des échantillons :*

Pour chaque échantillon de sol (séché et broyé < 250 µm), deux fois 0,6 g (+/- 0,05) sont pesés puis introduits dans des tubes à centrifuger Nalgène® en polycarbonates, afin d'obtenir deux sous-échantillons. **L'un des échantillons représentera** la « phase gastro-salivaire » que l'on nommera **phase gastrique** et **l'autre échantillon représentera** la phase « gastro-intestinale » que l'on nommera **phase intestinale.**

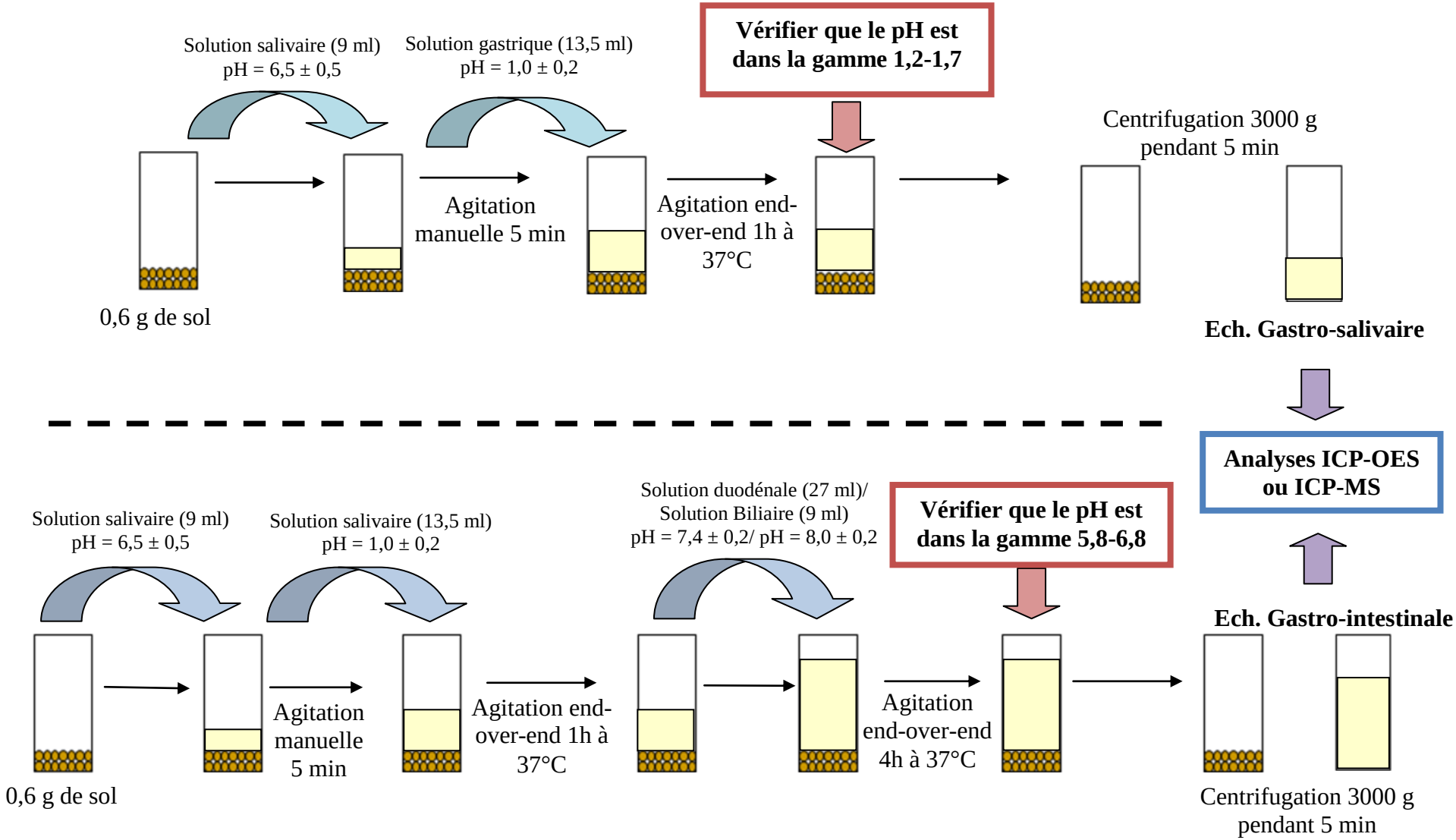


Figure 19 : Schéma récapitulatif du test *in vitro* unifié BARGE (UBM)

- *La procédure du test in vitro unifié BARGE (UBM)*

La figure 19 présente les caractéristiques et le déroulement du test *in vitro*. Le test *in vitro* UBM est réalisé dans des conditions aérobies. Dans un premier temps, le pH de l'échantillon blanc « gastrique » (9 ml solution salivaire + 13,5 ml solution gastrique) est mesuré afin de vérifier que celui-ci est dans la gamme comprise entre 1,2-1,7. Dans le cas contraire, le pH de la solution gastrique est ajusté avec de l'acide chlorhydrique (37%) ou de la soude à 10 M. Suite à cette vérification, le test de digestion commence par l'introduction de 9 mL de solution salivaire, dont le pH est de 6,5, à chaque échantillon de sol. Le mélange est agité manuellement pendant 5 minutes. Ensuite, on ajoute 13,5 mL de solution gastrique à un pH de 1,0. Le pH du mélange est contrôlé et fixé, le cas échéant, entre 1 et 1,2 à l'aide d'acide chlorhydrique (37% g/g). Puis le mélange est mis en rotation (end-over-end) pendant une heure à 37°C. A la fin de la phase gastrique, le pH de la solution est de nouveau contrôlé et celui-ci doit être dans la gamme comprise entre 1,2 à 1,7. Si le pH n'est pas compris dans cette gamme, l'expérience est arrêtée à ce niveau et deux nouveaux sous-échantillons du même sol sont utilisés au cours d'une nouvelle série, avec ajout dès le début d'acide chlorhydrique à 37% (g/g) (jusqu'à 1 ml) afin d'être dans la gamme de pH requise à la fin de la phase gastrique. En effet, le pH gastrique peut être hors de la gamme requise pour des sols fortement carbonatés. Cette étape est très importante pour ne pas sous-estimer les valeurs de bioaccessibilité des ETM qui peuvent reprécipiter avec l'augmentation du pH durant la phase gastrique. Si le pH à la fin de la phase gastrique est dans la gamme souhaitée, un des sous-échantillons de chaque sol est centrifugé à 3000 g pendant 5 minutes afin d'obtenir l'échantillon qui représentera la phase gastrique. Pour cela, le surnageant est prélevé puis stocké à 4°C avant d'être analysé.

Le deuxième sous-échantillon de chaque sol est utilisé pour poursuivre le test et ainsi réaliser la phase intestinale. Pour cet échantillon, à la suite de l'étape stomacale décrite ci-dessus, les solutions duodénale (27 mL, pH=7,8) et biliaire (9 mL, pH=8,0) sont ajoutées. Le pH du mélange est mesuré et celui-ci doit être dans la gamme de 6,3 ± 0,5. Dans le cas contraire, le pH de la solution est ajusté à 6,3 ± 0,5 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique à 37% ou d'une solution de soude à 10 M. Ce mélange est alors mis en rotation (end-over-end) pendant 4 heures à 37°C. Puis, l'agitation terminée, le pH est de nouveau mesuré afin de vérifier que le mélange est toujours dans la gamme de pH de 6,3 ± 0,5. Finalement, l'échantillon est

$$\text{Bioaccessibilité absolue (\%)} = \frac{\text{Concentration ETM mesurée dans les fluides digestifs (µg/g)}}{\text{Concentration ETM mesurée dans le sol suite à l'attaque par eau régale (µg/g)}} * 100$$

Équation 4 : Détermination de la bioaccessibilité absolue

$$\text{Bioaccessibilité relative (\%)} = \frac{\text{Bioaccessibilité absolue du contaminant dans la matrice sol (\%)}}{\text{Bioaccessibilité absolue du contaminant dans la forme de référence (\%)}} * 100$$

Équation 5 : Détermination de la bioaccessibilité relative

centrifugé à 3000 g pendant 5 minutes afin de prélever le surnageant. Puis, celui-ci est acidifié (1 ml HNO_3 à 65%) et stocké à 4°C avant d'être analysé. Pour chaque sol, les bioaccessibilités, gastrique et gastro-intestinale, sont mesurées en utilisant 5 réplicats.
Comme pour la biodisponibilité, la bioaccessibilité peut être décrite de manière absolue ou relative. Pour cela, la bioaccessibilité a été déterminée en utilisant 5 réplicats pour les formes de référence, qui ont été utilisées dans le cadre des expériences *in vivo* (acétate de plomb, chlorure de cadmium, arséniate de sodium et antimoniate de potassium), afin de pouvoir déterminer la bioaccessibilité relative des ETM dans les sols. Les valeurs de bioaccessibilité relative seront utilisées dans le cadre des corrélations *in vivo/in vitro*.

I.2) Analyses des échantillons et détermination de la bioaccessibilité

L'analyse des échantillons est réalisée au plus tard une semaine après leur obtention. Pour cela, les surnageants sont placés à température ambiante avant d'être analysés, dans un premier temps, par spectroscopie d'émission optique couplée à un plasma induit (ICP-OES) (Jobyn-Yvon, Ultima 2). Les courbes d'étalonnage, comprenant six points, sont réalisées entre 0 et 1000 µg/L ou entre 0 et 100 mg/L en fonction des concentrations en ETM dans les échantillons. Elles sont réalisées à partir d'une solution multi-élémentaire (QC4, SCP Sciences) diluée avec de l'acide nitrique 2%. L'appareil est de nouveau étalonné après le passage au maximum de 120 échantillons. De plus, pour chaque série d'analyse, un étalon de contrôle (50% du point haut de la gamme d'étalonnage) et un blanc de réactifs sont placés tous les 8 échantillons afin de vérifier le bon déroulement de l'analyse, la non contamination entre les échantillons et la possible dérive de la réponse de l'appareil dans le temps. Les limites de quantification ont été établies en utilisant la norme NFT 90-210 sur 20 réplicats de solutions digestives (gastro-salivaire et gastro-intestinale) dopés. Ainsi pour le plomb, le cadmium, l'arsenic et l'antimoine, les limites de quantification dans chacune des phases digestives du test UBM sont identiques pour un contaminant donné et sont égales à 40 µg/L, 10 µg/L, 40 µg/L et 40 µg/L, respectivement. Pour quelques sols faiblement concentrés et notamment pour la détermination de la bioaccessibilité de l'arsenic et de l'antimoine, des échantillons ont été analysés par ICP-MS (Perkin-Elmer, ELAN 6100 DRC). Cette technique plus sensible permet d'atteindre une limite de quantification plus faible, de 1 µg/L, pour l'ensemble des contaminants dans les deux phases digestives du test *in vitro*. Suite aux

analyses, le pourcentage de bioaccessibilité absolue et relative dans chacune des phases du test *in vitro* UBM peut être calculé selon les équations 4 et 5.

I.3) Contrôle qualité de l'étude *in vitro*

Pour s'assurer du bon déroulement du test *in vitro* et de la qualité des résultats plusieurs étapes de contrôle ont été réalisées :

- **Contrôle « blanc de réactifs »** : le test *in vitro* est réalisé pour chaque étape (phase gastro-salivaire et phase gastro-intestinale) sans ajout d'échantillon de sol (au minimum un échantillon par batch) ;

- **Contrôle sol** : deux matériaux de référence NIST (National Institute of Standards and Testing) SMR 2710 et SMR 2711 sont utilisés à chaque série afin de vérifier le bon déroulement du test de bioaccessibilité. De plus, des échantillons sont introduits dans chaque série afin de déterminer la reproductibilité du test *in vitro* et d'estimer l'incertitude de mesure sur les résultats de bioaccessibilité de chacun des ETM pour ces deux matériaux de référence.

I.4) Analyses statistiques

Le traitement des données et les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant les logiciels MINITAB 15 et STATBOX Pro 6.1. Pour chaque sol, la bioaccessibilité sera présentée sous la forme de moyenne ± l'écart type (n=5) dans chacune des phases digestives. Pour les deux matériaux de référence des cartes de contrôle ont été réalisées selon la norme XPT 90-220 afin de déterminer la reproductibilité du test *in vitro* (coefficient de variation) et de définir une incertitude sur la mesure pour chacun des contaminants et dans chacune des phases digestives. Ensuite, plusieurs analyses de variance (ANOVA), à un ou deux facteurs, suivi du test « post-hoc » de Tukey-Kramer ont été réalisés, afin de mettre en évidence pour chaque contaminant :

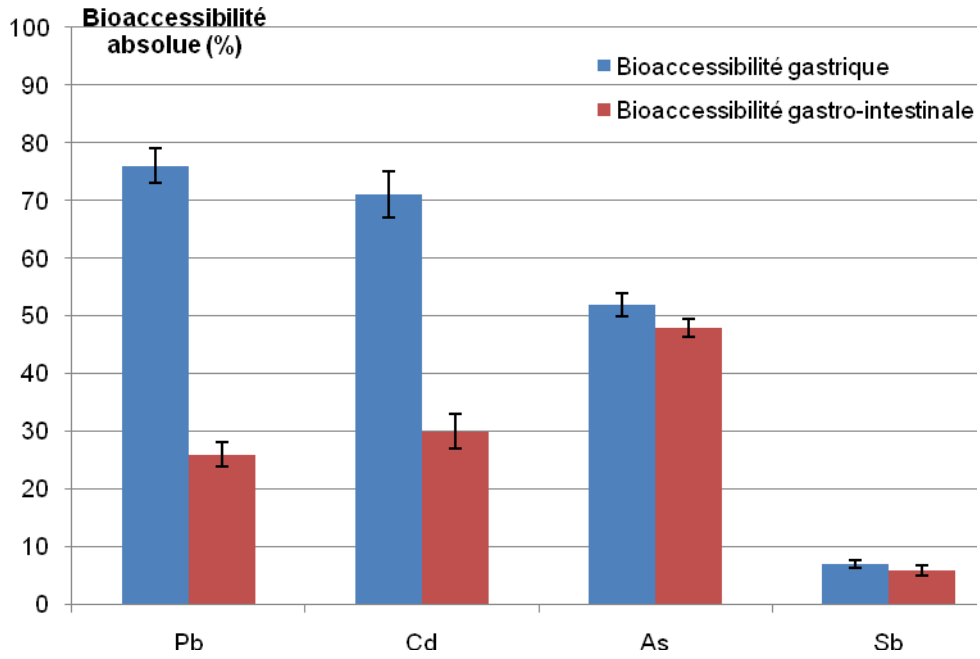


Figure 20: Bioaccessibilité absolue des éléments traces métalliques dans le sol de référence SMR 2710 (n=50)

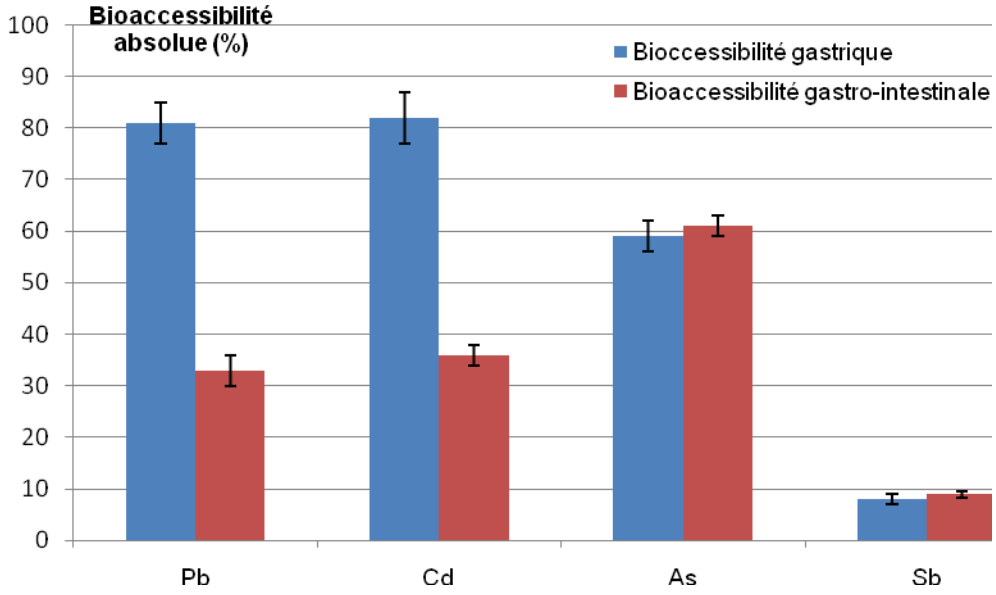


Figure 21 : Bioaccessibilité absolue des éléments traces métalliques dans le sol de référence SMR 2711 (n=50)

- des différences significatives entre les moyennes de bioaccessibilité obtenues entre la phase gastrique et la phase gastro-intestinale pour les 9 sols miniers puis les 6 sols de fonderie ;
- des différences significatives entre les moyennes de bioaccessibilité absolue et relative obtenues pour chacun des contaminants et chacune des phases digestives par des deux historiques de contamination ;
- des différences significatives de bioaccessibilité gastrique entre les différents sols ;
- des différences significatives de bioaccessibilité gastro-intestinale entre les différents sols.

Finalement, le test *U* de Mann-Whitney a également été utilisé pour mettre en évidence une différence significative de la bioaccessibilité moyenne des éléments métalliques en fonction de l'historique de contamination.

II.) Résultats

II.1) Bioaccessibilité absolue dans les matériaux de référence

La figure 20 présente les résultats de bioaccessibilité obtenus pour le matériau de référence SMR 2710. Les résultats montrent que la bioaccessibilité gastrique absolue est de 76%, 71%, 52% et 7% pour le plomb, le cadmium, l'arsenic et l'antimoine respectivement. La bioaccessibilité absolue est réduite de manière significative ($p<0,05$) dans la phase intestinale : 27% contre 70% pour le plomb, et 30% contre 71% pour le cadmium.
De la même manière, la figure 21présente les résultats de bioaccessibilité obtenus pour le sol de référence SMR 2711. Pour ce sol, les résultats montrent que la bioaccessibilité gastrique absolue est de 80%, 82%, 58% et 8% pour le plomb, le cadmium, l'arsenic et l'antimoine respectivement. Comme pour le sol SMR 2710, il y a une diminution significative ($p< 0,05$) de la bioaccessibilité intestinale absolue uniquement pour le plomb et le cadmium (bioaccessibilité de 33% et 36%, respectivement).

Tableau 27 : Valeurs minimales, maximales et moyennes de bioaccessibilité des ETM dans les matériaux de référence (SMR 2710 et SMR 2711) déterminées à partir des différentes études publiées

		Pb[§]		Cd[§]		As[§]		Sb[§§]	
		Phase Gastrique	Phase intestinale	Phase Gastrique	Phase intestinale	Phase Gastrique	Phase intestinale	Phase Gastrique	Phase intestinale
SMR 2710	**Bioaccessibilité minimale (%)**	41	3	35	6	10	7	-	-
	Bioaccessibilité maximale(%)	90	54	90	49	59	50	-	-
	Bioaccessibilité moyenne (%)	60	23	67	22	43	35	-	-
SMR 2711	**Bioaccessibilité minimale (%)**	35	7	41	11	7	5	-	-
	Bioaccessibilité maximale (%)	89	45	99	59	62	70	-	-
	Bioaccessibilité moyenne (%)	72	27	70	25	47	41	-	-

§ Les données sont basées sur les études de : Hamel *et al.* (1998) ; Ellickson *et al.* (2001) ; Oomen *et al.* (2002) ; Cave *et al.* (2003) ; Oomen *et al.* (2003a) ; Schroder *et al.*, (2003) ; Pouschat *et al.* (2006) ; Bosso *et al.* (2007) ; Denys *et al.* (2007) ; USEPA (2007b) ; Roussel *et al.* (2008).

§§ Pour l'antimoine, il n'y a pas de valeurs de bioaccessibilité publiées.

Au contraire des analyses en concentration totale en ETM dans les sols, pour valider les résultats de bioaccessibilité obtenus par le biais du test *in vitro* UBM, il n'existe pas de valeurs de bioaccessibilité certifiées pour un matériau de référence. Par conséquent, actuellement, il n'est pas possible de s'assurer de la qualité de la mesure de la bioaccessibilité en se basant sur un matériau de référence. Cependant, les deux matériaux de référence (SMR 2710 et SMR 2711) ont été choisis étant donné que ces échantillons sont généralement utilisés pour évaluer la qualité de la mesure de la bioaccessibilité, pour un test donné, des ETM dans les sols au sein des différentes études publiées dans la littérature (Hamel *et al.*, 1998 ; Oomen *et al.*, 2002 ; USEPA, 2007a). Actuellement, il n'y a pas de valeurs publiées de bioaccessibilité obtenues par le test *in vitro* UBM pour ces deux matériaux de référence. Un recueil bibliographique des valeurs de bioaccessibilité pour ces deux matériaux de référence (Tableau 27) met en évidence la dispersion des valeurs obtenues pour le plomb, le cadmium et l'arsenic. Cette variabilité est bien imputable au type de tests *in vitro* utilisés. Les valeurs cibles de bioaccessibilité déterminées dans le cadre de notre étude (Tableau 28) sont incluses dans ces gammes de variation. Par conséquent, les valeurs obtenues au sein de l'étude pourraient servir, par la suite, de base de comparaison pour valider la qualité de la mesure de la bioaccessibilité par le test UBM pour les organismes qui souhaiteraient utiliser ce test.

Afin de définir la reproductibilité des données et d'estimer une incertitude sur ces données, des cartes de contrôle ont été établies pour chacun des matériaux de référence. Le tableau 28 indique le coefficient de variation déterminé pour chaque phase digestive à partir de 50 résultats d'analyse pour les deux matériaux de référence et pour chacun des contaminants. Les coefficients de variation sont inférieurs à 10% dans la phase gastrique et la phase intestinale pour le plomb, le cadmium et l'arsenic et inférieurs à 20% pour l'antimoine pour les deux matériaux de référence. Ainsi, ces résultats montrent que les valeurs de bioaccessibilité obtenues sont répétables.

D'autre part, ces résultats ont permis d'estimer une incertitude sur la mesure de bioaccessibilité pour chaque contaminant. Celle-ci fluctue pour la phase gastrique entre 10% et 20% pour le plomb, le cadmium, l'arsenic et de 10% à 15% pour la phase intestinale.

Tableau 28 : Résumé des résultats des cartes de contrôle établies selon la norme XPT 90-220 pour les matériaux de référence SMR 2710 et SMR 2711

			Pb		Cd		As		Sb	
			Phase gastrique	Phase intestinale	Phase gastrique	Phase intestinale	Phase gastrique	Phase intestinale	Phase gastrique	Phase intestinale
SMR 2710	**Reproductibilité (n=50)**	Ecart-type	2,4	1,4	6,7	1,8	2,8	2,8	0,34	0,9
		Coefficient de variation (%)	3,2	2,8	9,5	5,5	5,6	5,5	4,5	10,9
	Représentativité	Concentration totale $mg.kg^{-1}$	5532		21,8		626		38,4	
		Valeur cible calculée (% de la concentration totale)	75	29	71	34	50	50	7,6	7,9
	Incertitude totale relative selon la norme XP T 90-220	%	10	10	20	15	15	15	10	25
SMR 2711	**Reproductibilité (n=50)**	Ecart-type	4,4	2,3	2,3	3,8	1,3	3	1,2	0,8
		Coefficient de variation (%)	5,3	7,0	2,8	9,9	2,1	5,0	12,9	17,1
	Représentativité	Concentration totale $mg.kg^{-1}$	1162		41,7		105		19,4	
		Valeur cible calculée (% de la concentration totale)	82	32	82	38	60	61	9	9
	Incertitude totale relative selon la norme XP T 90-220	%	15	15	10	20	5	10	30	35

Il est important de noter tout de même que, dans le cas des deux matériaux de référence, l'incertitude est liée à la fois à la concentration de l'élément dans la matrice et à sa bioaccessibilité, ce qui explique les incertitudes plus importantes obtenues pour l'antimoine qui est l'élément le moins concentré et le moins bioaccessible. En effet, pour cet élément, les incertitudes varient de 10% à 30% en fonction de l'échantillon et de la phase digestive considérée.

II.2) Bioaccessibilité absolue pour les formes de référence

Les résultats de bioaccessibilité absolue de chaque forme de référence sont regroupés au sein du tableau 29. Premièrement, ces résultats confirment que les quatre formes de référence sont quasiment, en totalité soluble, dans la phase gastrique. Pour le plomb et le cadmium, la bioaccessibilité de la forme de référence diminue de 30 points[12] environ entre la phase gastrique et la phase intestinale. Au contraire, pour les contaminants présents sous une forme anionique tels que l'arsenic et l'antimoine, les valeurs de bioaccessibilité pour chaque forme de référence sont quasiment identiques pour les deux phases digestives du test *in vitro* UBM et sont proches de 100%. Ces résultats indiquent que par rapport aux formes de référence considérées et pour un échantillon de sol donné, les bioaccessibilités relatives pour l'arsenic et l'antimoine seront proches des biodisponibilités absolues. Pour le plomb et le cadmium il y aura des différences, pour la phase intestinale, entre les valeurs. Par conséquent, pour la suite des résultats, les valeurs de bioaccessibilité absolue et relative seront présentées pour les cations (plomb et le cadmium) alors que pour les anions étudiés (arsenic et antimoine), dans un souci de synthèse et afin de simplifier la présentation des résultats du document, seules les valeurs de bioaccessibilité relative seront présentées.

[12] C'est à dire une diminution de 30 unités

Tableau 29 : Bioaccessibilité absolue (%) de chaque forme de référence utilisée pour la détermination de la biodisponibilité relative (moyenne ± écart-type, n=5)

Forme de référence	Bioaccessibilité absolue dans la phase gastrique (%)	Bioaccessibilité absolue dans la phase intestinale (%)
Acétate de plomb : $Pb(CH_3COO)_2$	99 ± 2	65 ± 3
Chlorure de cadmium : $CdCl_2$	98 ± 4	68 ± 3
Arséniate de sodium : $AsNa_3O_4$	95 ± 3	92 ± 4
Antimoniate de potassium : $KSbOH_6$	93 ± 5	90 ± 2

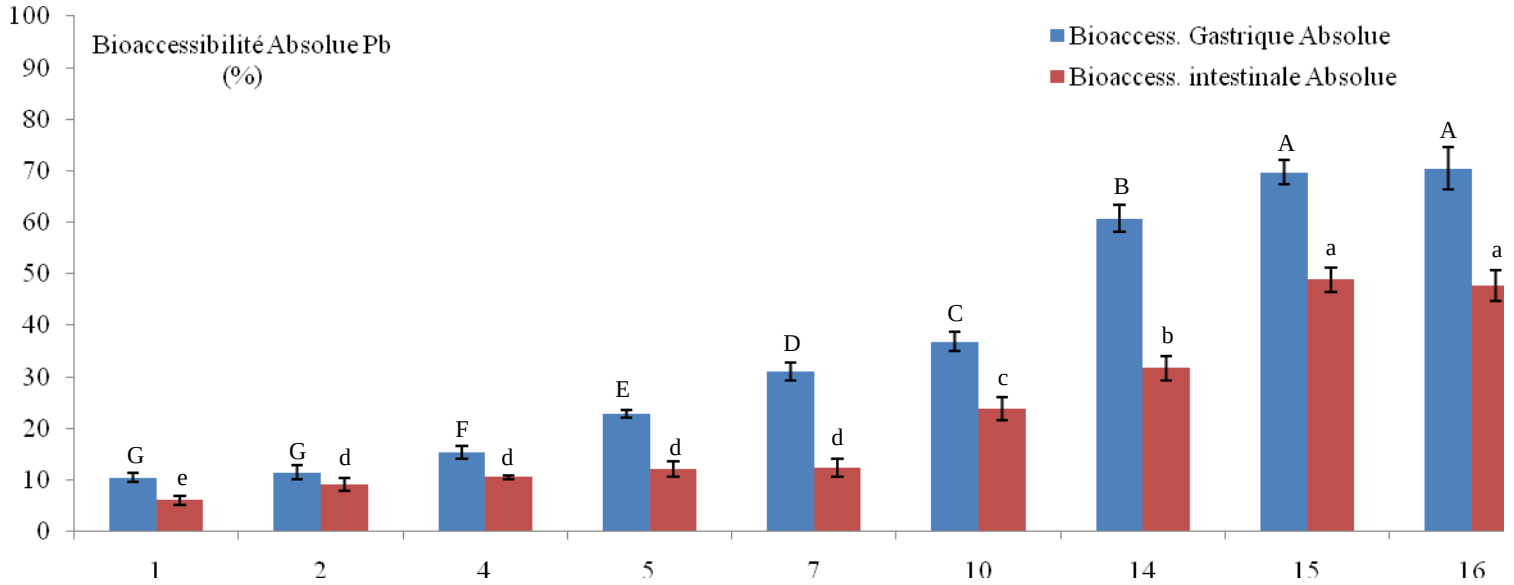


Figure 22 : Bioaccessibilité absolue du plomb dans les sols miniers, moyenne ± écart-type (n=5). Une lettre commune (majuscule pour la phase gastrique et minuscule pour la phase intestinale) montre l'absence de différence significative entre les sols (Test de Tukey-Kramer, α = 5%)

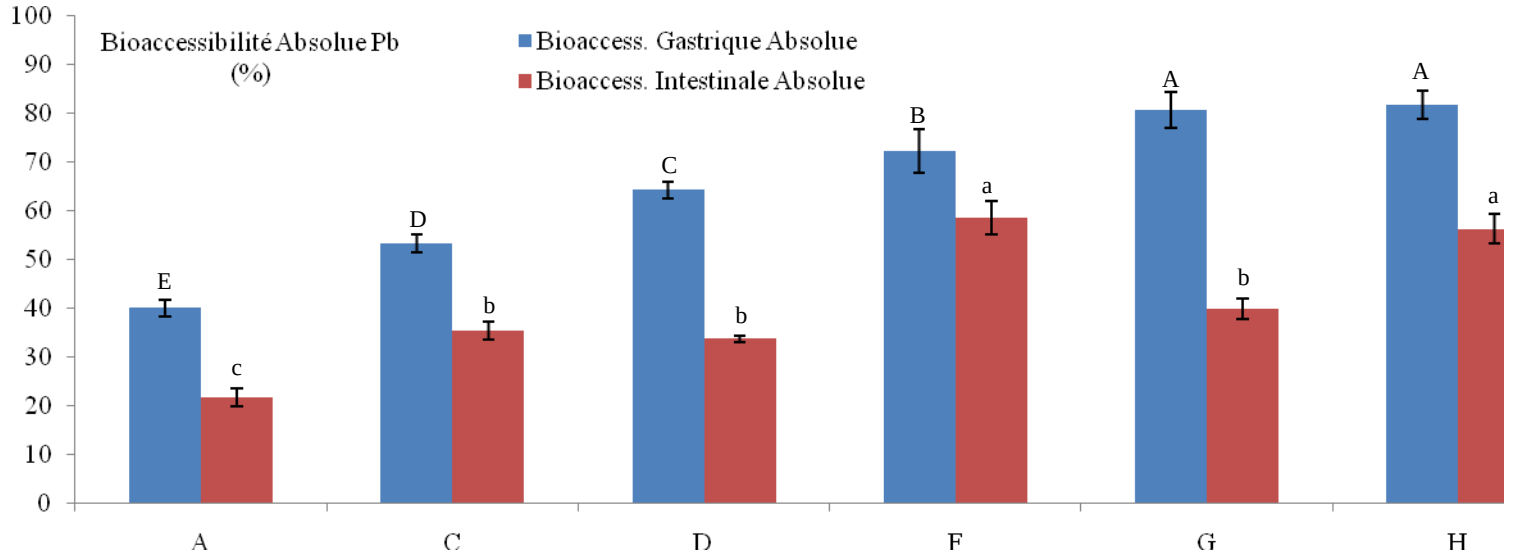


Figure 23 : Bioaccessibilité absolue du plomb dans les sols de fonderie, moyenne ± écart-type (n=5). Une lettre commune (majuscule pour la phase gastrique et minuscule pour la phase intestinale) montre l'absence de différence significative entre les sols (Test de Tukey-Kramer, α = 5%)

II.3) Bioaccessibilité des ETM dans les sols contaminés

II.3.1) Résultats de bioaccessibilité pour le plomb

II.3.1.1) Bioaccessibilité gastrique absolue du plomb

La bioaccessibilité absolue du plomb, dans la phase gastrique, varie de 10% à 82% pour l'ensemble des 15 sols prélevés sur les deux sites contaminés (Figures 22 et 23). Le coefficient de variation moyen pour l'ensemble des valeurs est inférieur à 5% ce qui confirme que les valeurs de bioaccessibilité du plomb dans la phase gastrique obtenues avec le test *in vitro* UBM sont très répétables. La gamme de bioaccessibilité du plomb entre les différents sols miniers est plus variable que la gamme de bioaccessibilité du plomb pour les différents sols de la fonderie. Pour les sols échantillonnés sur les sites miniers, la bioaccessibilité gastrique absolue varie entre 10% et 70%. Elle varie entre 40% et 82% pour ceux contaminés par les dépôts atmosphériques de la fonderie. Le pourcentage de bioaccessibilité du plomb pour chacun des sols est indépendant de la concentration totale en plomb ($p > 0,05$). Par contre, les résultats de l'analyse de variance permettent de différencier les sols entre eux en termes de bioaccessibilité ($\alpha = 5\%$). Par exemple, les valeurs de bioaccessibilité du plomb sur les sites miniers les plus faibles ont été obtenues pour les résidus miniers (scories) (sols 1, 2, 4). Finalement, la valeur moyenne de bioaccessibilité est significativement plus faible pour les sols miniers (37%, n= 9) par rapport à celle obtenue pour les sols échantillonnés à proximité de la fonderie (65%, n= 6) (Test *U*, $\alpha = 5\%$).

II.3.1.2) Bioaccessibilité intestinale absolue du plomb

La bioaccessibilité absolue du plomb dans la phase intestinale varie de 6% à 59% pour l'ensemble des sols des deux sites contaminés (Figures 22 et 23). Le coefficient de variation moyen pour l'ensemble des valeurs est inférieur à 8%. Pour les sols échantillonnés sur les sites miniers, la bioaccessibilité intestinale absolue varie de 6% à 49% et de 22% à 59% pour les sols échantillonnés sur le site contaminé par les dépôts atmosphériques de la fonderie. Une analyse de variance indique que la bioaccessibilité intestinale absolue moyenne pour les

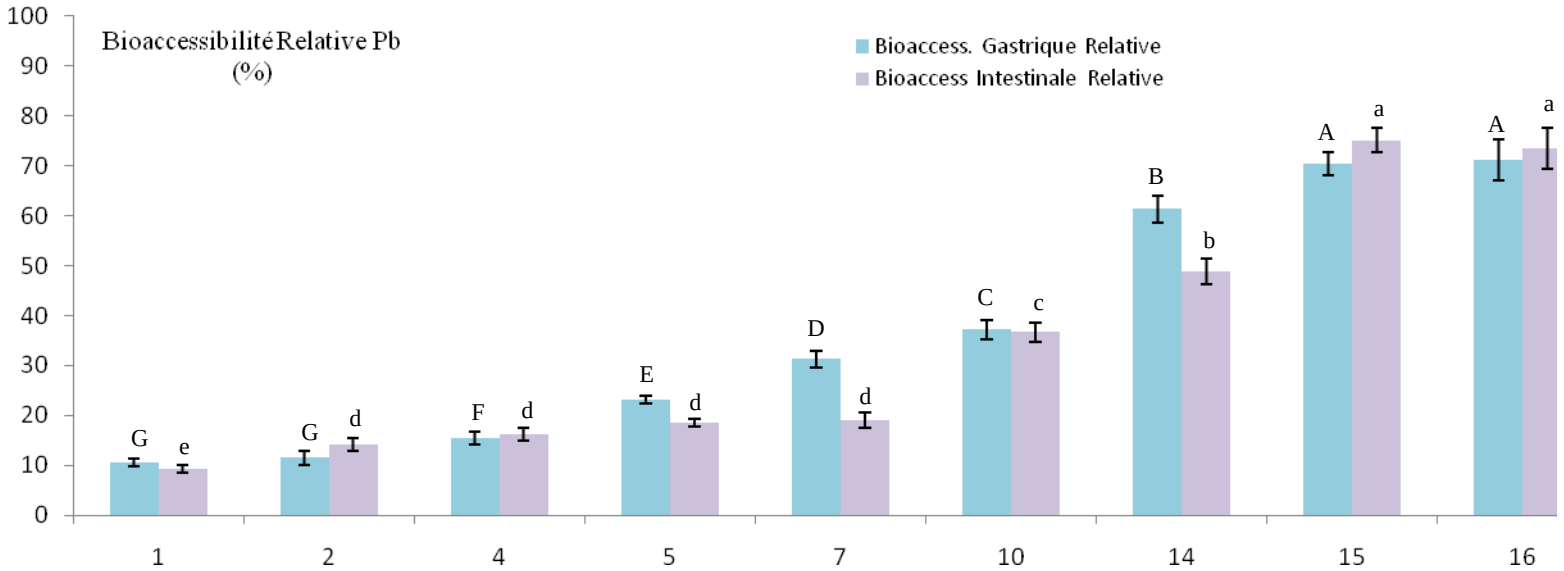


Figure 24 : Bioaccessibilité relative du plomb dans les sols miniers, moyenne ± écart-type (n=5). Une lettre commune (majuscule pour la phase gastrique et minuscule pour la phase intestinale) montre l'absence de différence significative entre les sols (Test de Tukey-Kramer, α = 5%)

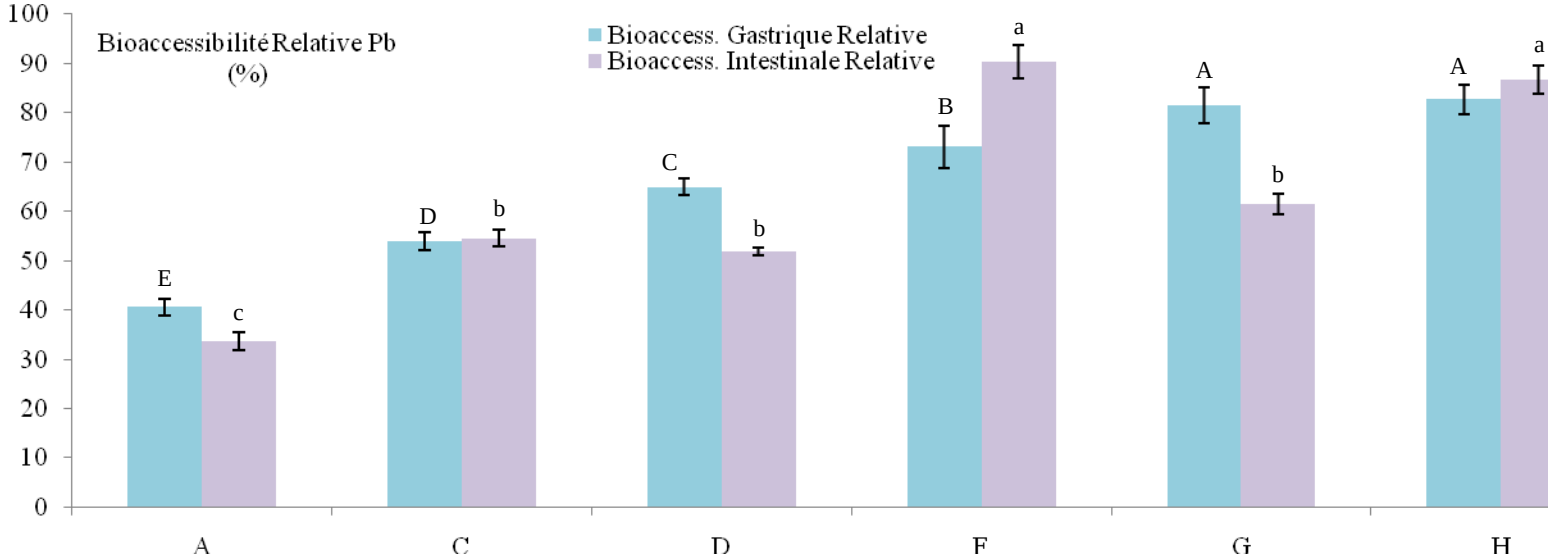


Figure 25 : Bioaccessibilité relative du plomb dans les sols de fonderie, moyenne ± écart-type (n=5). Une lettre commune (majuscule pour la phase gastrique et minuscule pour la phase intestinale) montre l'absence de différence significative entre les sols (Test de Tukey-Kramer, α = 5%)

9 sols miniers (22%) et pour les 6 sols de fonderie (41%) est significativement inférieure à la bioaccessibilité gastrique absolue moyenne de chacun des sites contaminés (37% et 65%, respectivement) (α = 5%). De plus, les résultats montrent que le pourcentage de réduction de la bioaccessibilité du plomb entre les deux phases digestives du test UBM est différent en fonction des sols. En effet, la diminution du pourcentage de bioaccessibilité entre les deux phases du test varie de 2 à 41 points en fonction des sols. Finalement, comme pour la phase gastrique, une valeur moyenne de bioaccessibilité intestinale significativement plus faible est obtenue pour les sols miniers par rapport aux sols de fonderie (22% et 42%, respectivement) (Test *U*, α = 5%).

II.3.1.3) Bioaccessibilité relative du plomb

Les figures 24 et 25 présentent les valeurs de bioaccessibilité relative du plomb dans chacune des phases du test *in vitro*. Les résultats pour la phase gastrique sont identiques à ceux obtenus pour la bioaccessibilité absolue ($p > 0,05$). Par contre, pour la phase intestinale, les valeurs de bioaccessibilité relative sont significativement supérieures aux valeurs de bioaccessibilité intestinale absolue ($p < 0,05$). Pour les sols échantillonnés sur les sites miniers, la bioaccessibilité intestinale relative varie de 9% à 75% et de 34% à 90% pour les sols échantillonnés sur le site contaminé par les dépôts atmosphériques de la fonderie. En relatif, l'impact de la remontée du pH entre les deux phases digestives est pris en considération à la fois pour bioaccessibilité du plomb dans les sols et également pour la bioaccessibilité de la forme de référence. Par conséquent, la bioaccessibilité gastro-intestinale du plomb devrait être similaire à la bioaccessibilité gastrique. En effet, une analyse de variance montre qu'en relatif les valeurs moyennes de bioaccessibilité gastrique (37%) et gastro-intestinale (35%) sont non significativement différentes ($p > 0,05$) pour les sols miniers. Le même résultat est obtenu en comparant les moyennes de bioaccessibilité relative dans chacune des phases digestives pour les 6 sols de fonderie (66% et 63%) ($p > 0,05$). Cependant, étant donné que la diminution de la bioaccessibilité absolue entre les deux phases digestives n'est pas similaire entre les sols, des différences significatives sont observées entre les deux phases pour certains sols comme les sols 7, 14, D, F et G (Figures 24 et 25).

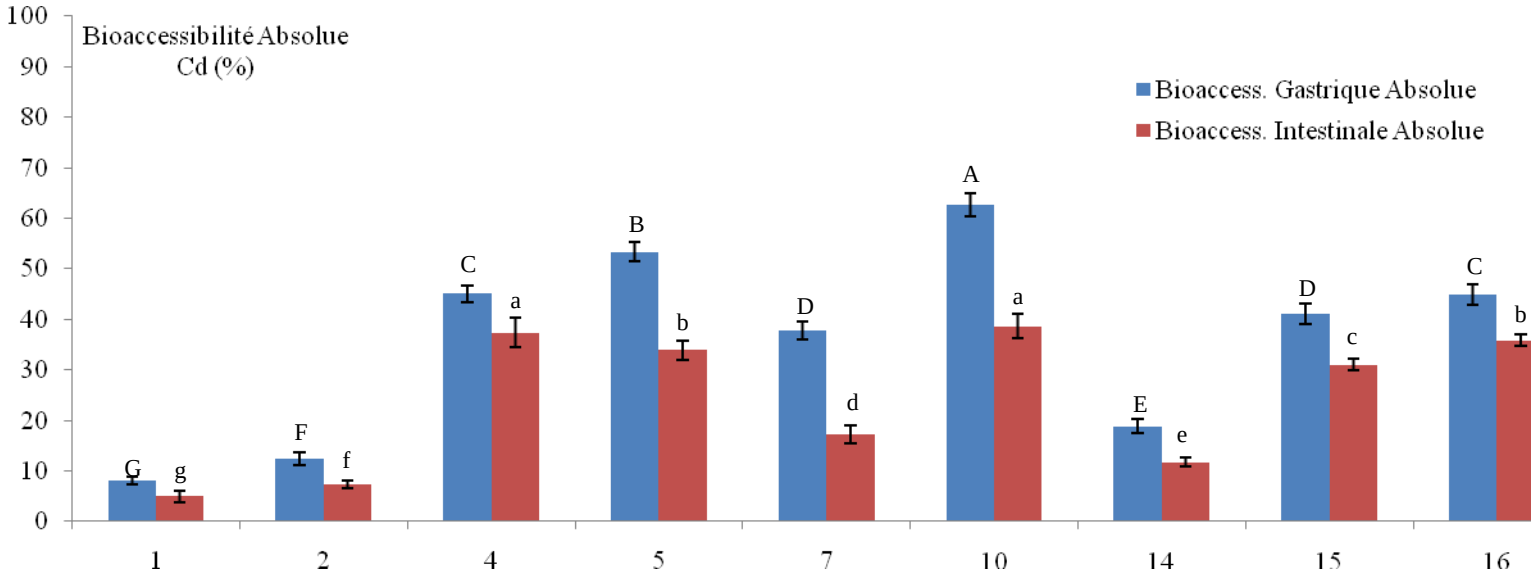


Figure 26 : Bioaccessibilité absolue du cadmium dans les sols miniers, moyenne ± écart-type (n=5). Une lettre commune (majuscule pour la phase gastrique et minuscule pour la phase intestinale) montre l'absence de différence significative entre les sols (Test de Tukey-Kramer, α = 5%)

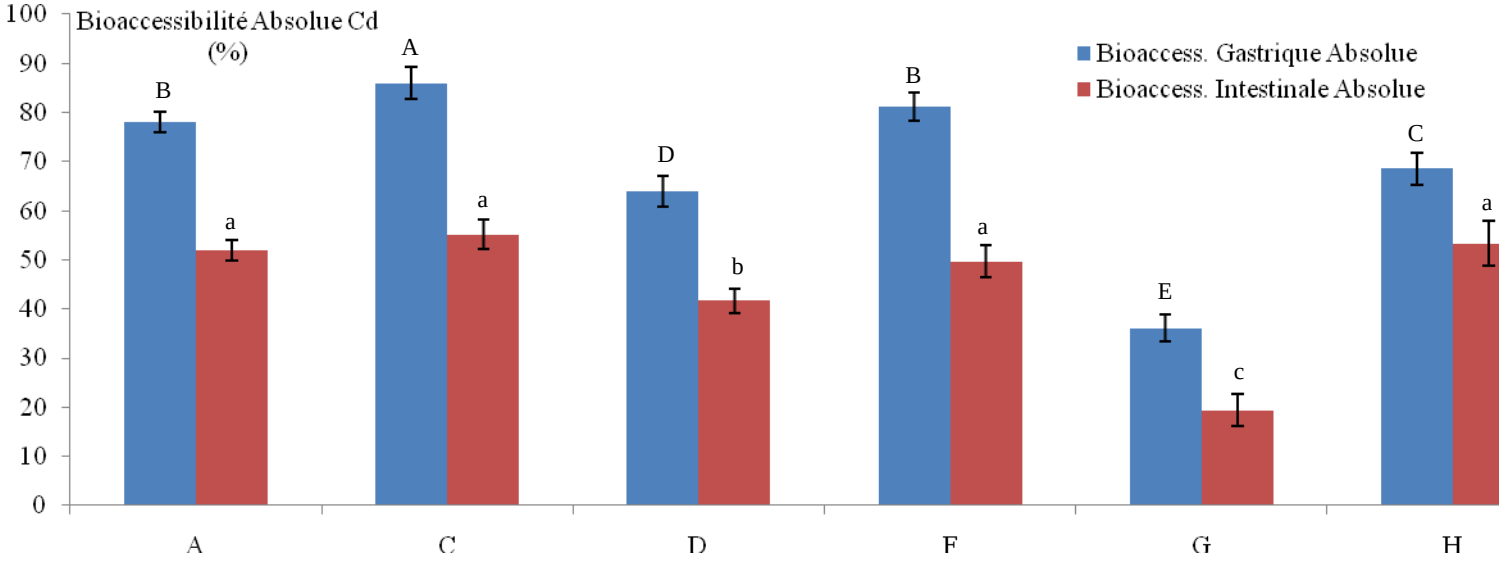


Figure 27 : Bioaccessibilité absolue du cadmium dans les sols de fonderie, moyenne ± écart-type (n=5). Une lettre commune (majuscule pour la phase gastrique et minuscule pour la phase intestinale) montre l'absence de différence significative entre les sols (Test de Tukey-Kramer, α = 5%)

II.3.2) Résultats de bioaccessibilité pour le cadmium

II.3.2.1) Bioaccessibilité gastrique absolue du cadmium

Les figures 26 et 27 présentent les résultats de bioaccessibilité gastrique absolue du cadmium pour l'ensemble des sols des deux historiques de contamination. Pour les sols échantillonnés sur les sites miniers, la bioaccessibilité gastrique absolue varie de 8% à 63% et de 36% à 86% pour les sols échantillonnés sur le site contaminé par les dépôts atmosphériques de la fonderie. Le coefficient de variation pour l'ensemble des valeurs est inférieur à 4%. A l'instar du plomb, le pourcentage de bioaccessibilité du cadmium dans les 15 sols est indépendant de la concentration totale ($p > 0,05$). De plus, une valeur moyenne de bioaccessibilité absolue significativement plus faible est obtenue pour les sols miniers (valeur moyenne de 36%) par rapport à celle obtenue pour les sols échantillonnés à proximité de la fonderie (valeur moyenne de 69%) (Test *U*, $\alpha = 5\%$).

II.3.2.2) Bioaccessibilité intestinale absolue du cadmium

Les figures 26 et 27 montrent les résultats de la bioaccessibilité absolue du cadmium dans la phase intestinale pour chaque historique de contamination. Une bioaccessibilité intestinale moyenne de 24% (min 5% ; max 39%) est observée pour les 9 sols miniers. Cette dernière est significativement inférieure ($p < 0,05$) à celle pour les 6 sols de fonderie obtenue (moyenne 45% ; min 19% ; max 55%). Cependant, comme pour le plomb, la diminution du pourcentage de bioaccessibilité du cadmium entre les deux phases digestives du test *in vitro* est différente en fonction des sols variant entre 3 et 32 points.

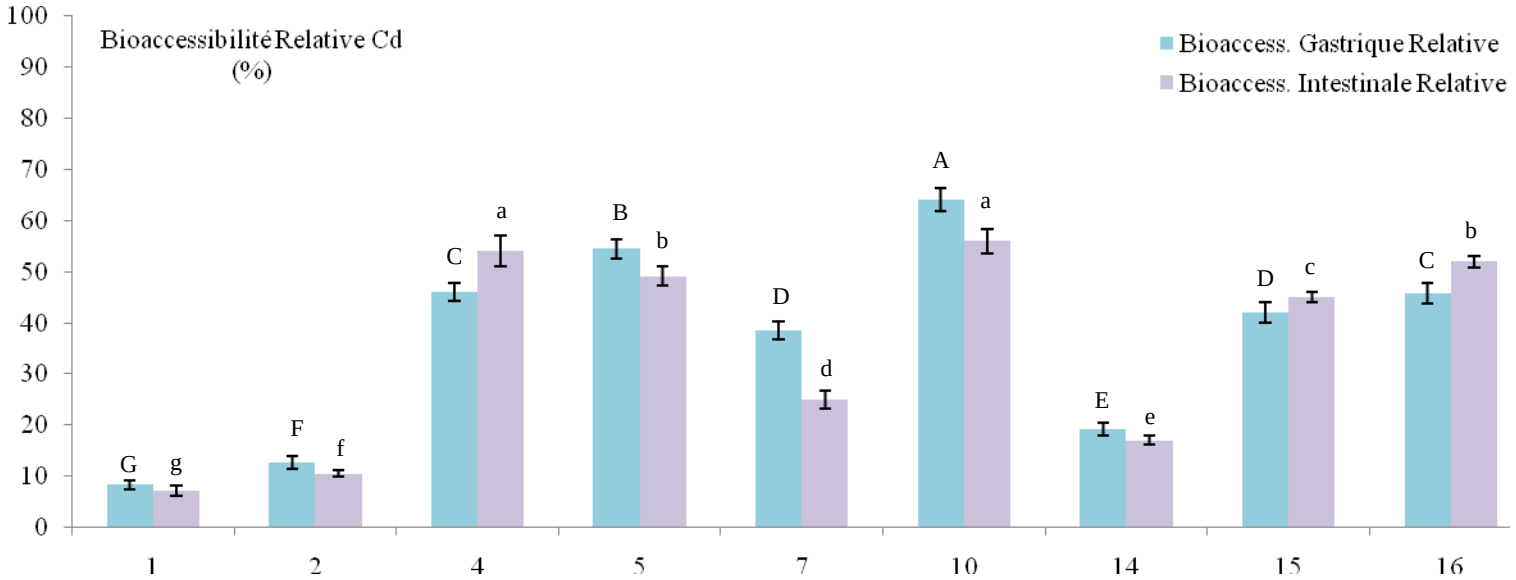


Figure 28 : Bioaccessibilité relative du cadmium dans les sols miniers, moyenne ± écart-type (n=5). Une lettre commune (majuscule pour la phase gastrique et minuscule pour la phase intestinale) montre l'absence de différence significative entre les sols (Test de Tukey-Kramer, α = 5%)

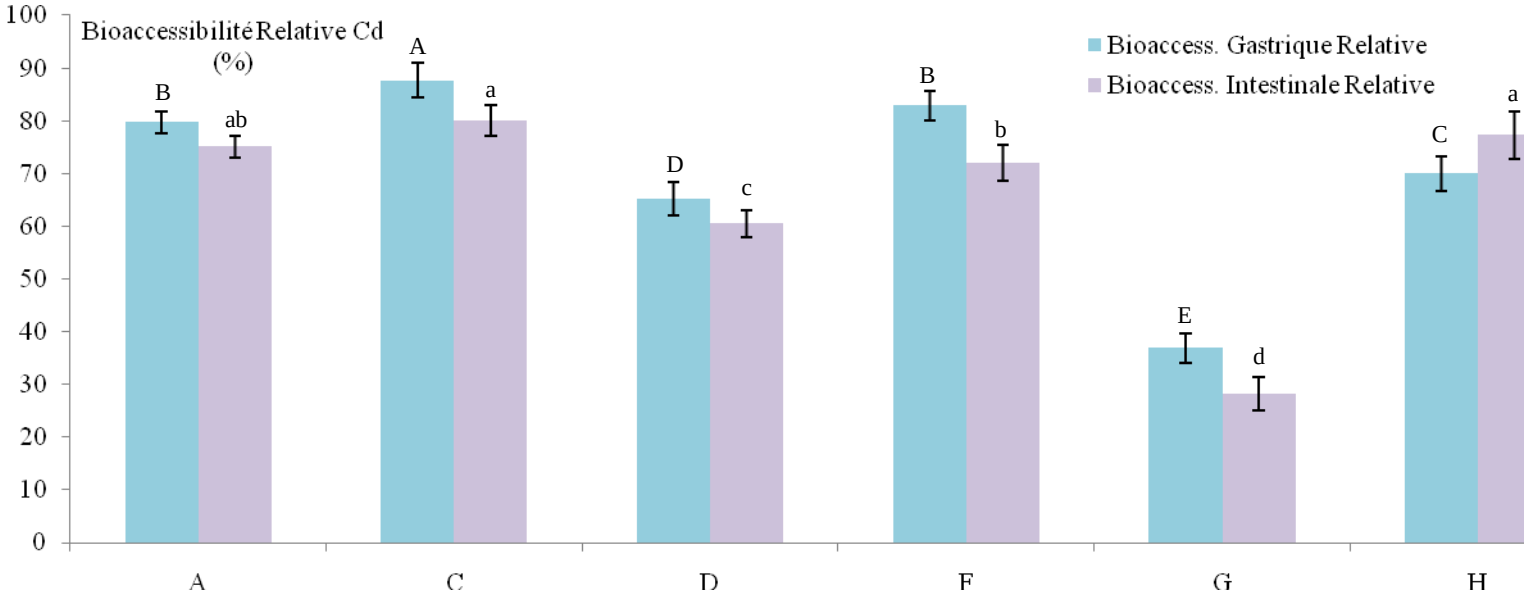


Figure 29 : Bioaccessibilité relative du cadmium dans les sols de fonderie, moyenne ± écart-type (n=5). Une lettre commune (majuscule pour la phase gastrique et minuscule pour la phase intestinale) montre l'absence de différence significative entre les sols (Test de Tukey-Kramer, α = 5%)

II.3.1.3) Bioaccessibilité relative du cadmium

Les figures 28 et 29 présentent les valeurs de bioaccessibilité relative du cadmium dans chacune des phases du test *in vitro* pour les deux historiques de contamination. Les résultats pour la phase gastrique sont identiques à ceux obtenus pour la bioaccessibilité absolue. Au contraire, pour la phase intestinale, les valeurs de bioaccessibilité relative sont significativement supérieures ($p<0,05$), pour l'ensemble des sols, aux valeurs de bioaccessibilité absolue. Pour les sols échantillonnés sur les sites miniers, la bioaccessibilité intestinale relative varie de 7% à 75% et de 28% à 80% pour les sols échantillonnés sur le site contaminé par les dépôts atmosphériques de la fonderie. L'analyse de variance montre qu'en relatif les valeurs moyennes de bioaccessibilité gastrique (37%) et gastro-intestinale (35%) sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) pour les sols miniers. Le même résultat est obtenu en comparant les moyennes de bioaccessibilité relative dans chacune des phases digestives pour les 10 sols de fonderie (70% et 66%, respectivement) ($p > 0,05$). Cependant comme pour le plomb, les résultats montrent que pour certains sols (4, 7, 10, F et G), il demeure une différence significative entre les deux phases digestives pour la bioaccessibilité relative du cadmium.

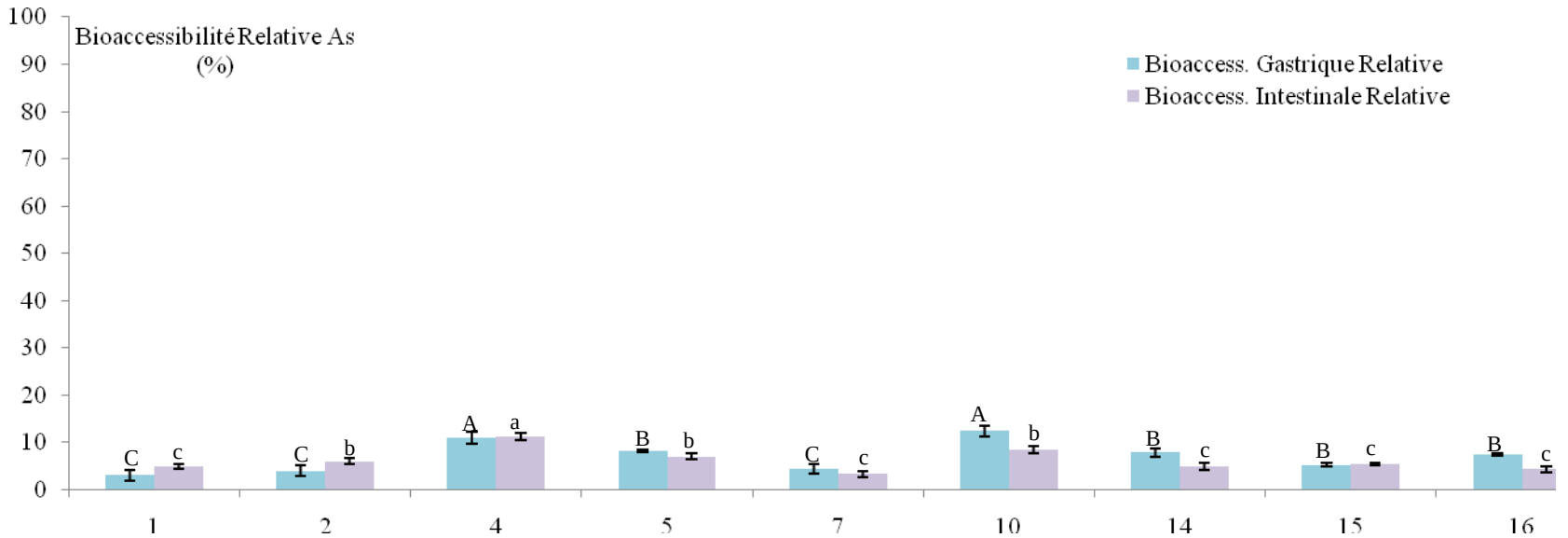


Figure 30 : Bioaccessibilité relative de l'arsenic dans les sols miniers, moyenne ± écart-type (n=5). Une lettre commune (majuscule pour la phase gastrique et minuscule pour la phase intestinale) montre l'absence de différence significative entre les sols (Test de Tukey-Kramer, α = 5%)

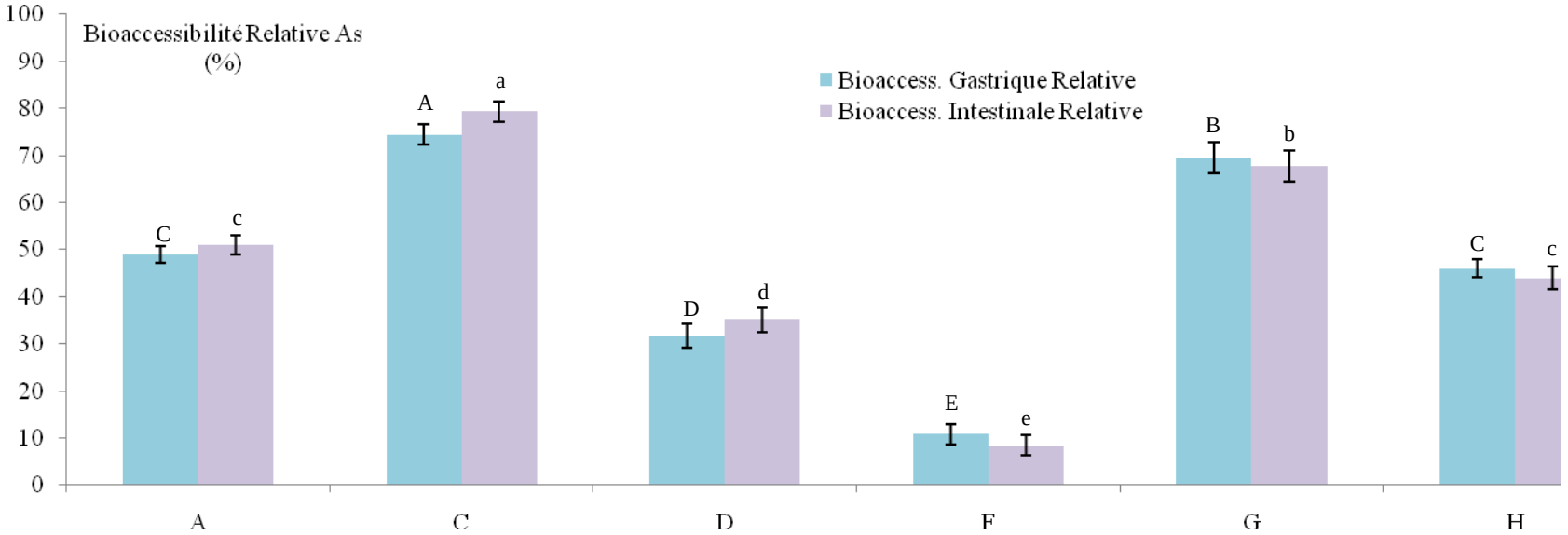


Figure 31 : Bioaccessibilité relative de l'arsenic dans les sols de fonderie, moyenne ± écart-type (n=5). Une lettre commune (majuscule pour la phase gastrique et minuscule pour la phase intestinale) montre l'absence de différence significative entre les sols (Test de Tukey-Kramer, α = 5%)

II.3.3) Résultats de bioaccessibilité pour l'arsenic

Comme précisé précédemment, pour l'arsenic seuls les résultats de bioaccessibilité relative sont présentés étant donné qu'il n'y a pas de différence significative entre les données de bioaccessibilité en absolue et en relatif pour l'ensemble des sols ($p > 0,05$). Les résultats de la bioaccessibilité relative de l'arsenic dans chacune des phases digestives et pour chaque site contaminé sont présentés sur les figures 30 et 31. Le coefficient de variation moyen pour l'ensemble des valeurs est inférieur à 10% ce qui montre que les valeurs de bioaccessibilité de l'arsenic dans chacune des phases obtenues avec le test *in vitro* BARGE sont répétables. Les résultats montrent que la bioaccessibilité de l'arsenic est très différente en fonction des sols. La gamme de bioaccessibilité de l'arsenic est plus importante pour les sols de fonderie que pour les sols miniers. En effet, la bioaccessibilité de l'arsenic dans les sols miniers varie de 3% à 12% pour les 9 sols et de 11% à 74% pour les 6 sols échantillonnés à proximité de la fonderie. Par contre, le test *U* de Mann-Whitney confirme qu'il y a une différence significative entre la valeur moyenne de bioaccessibilité obtenue pour chaque site contaminé (7% et 47%, pour le site minier et site fonderie, respectivement).

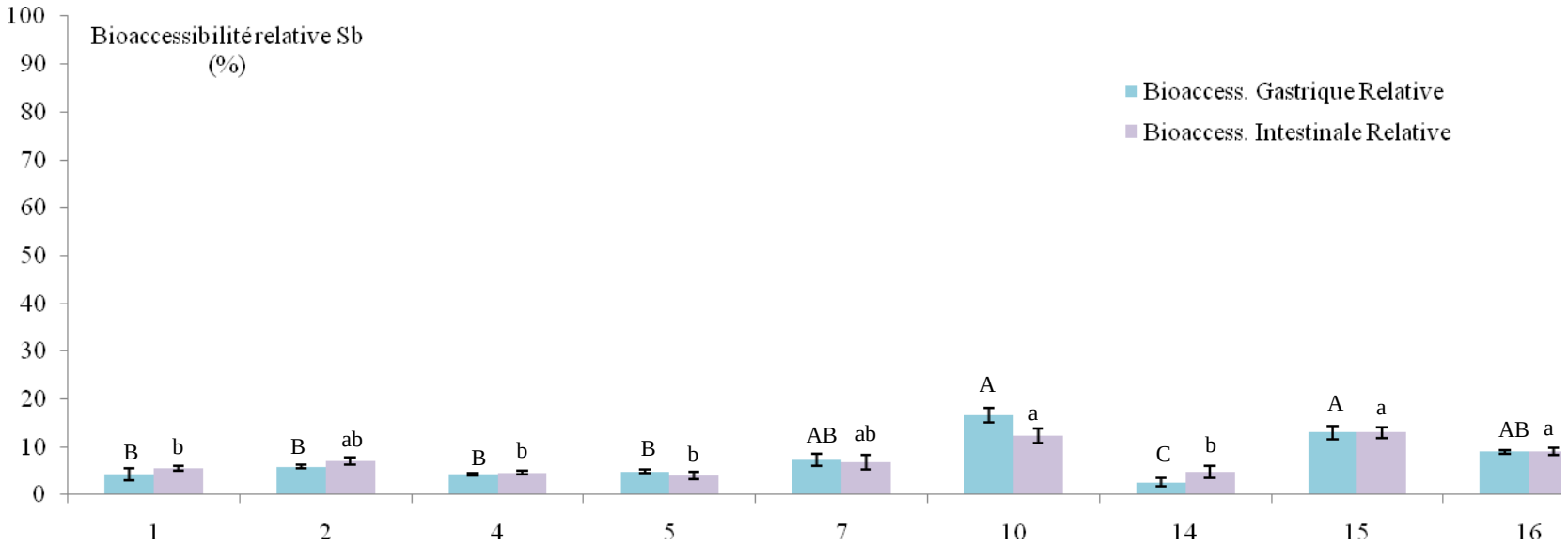


Figure 32 : Bioaccessibilité relative de l'antimoine dans les sols miniers, moyenne ± écart-type (n=5). Une lettre commune (majuscule pour la phase gastrique et minuscule pour la phase intestinale) montre l'absence de différence significative entre les sols (Test de Tukey-Kramer, α = 5%)

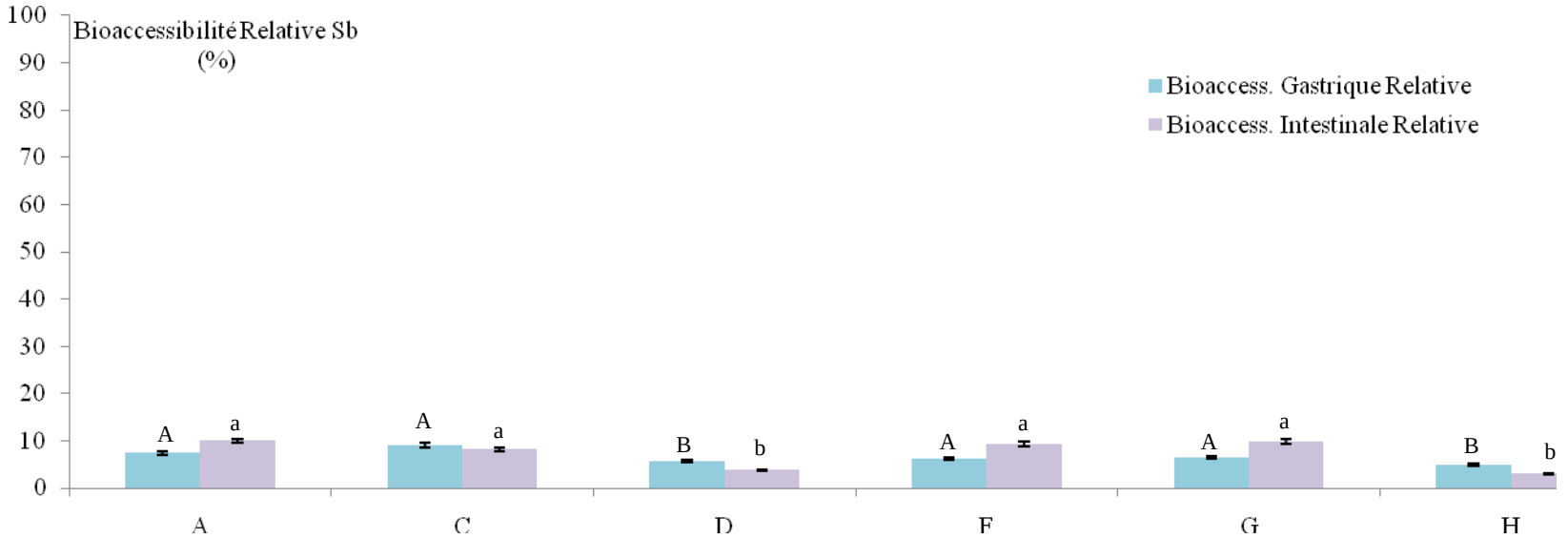


Figure 33 : Bioaccessibilité relative de l'antimoine dans les sols de fonderie, moyenne ± écart-type (n=5). Une lettre commune (majuscule pour la phase gastrique et minuscule pour la phase intestinale) montre l'absence de différence significative entre les sols (Test de Tukey-Kramer, α = 5%)

II.3.4) Résultats de bioaccessibilité pour l'antimoine

De même que pour l'arsenic, seuls les résultats de bioaccessibilité relative sont présentés pour l'antimoine. Les résultats montrent qu'indépendamment de l'historique de contamination, la bioaccessibilité de l'antimoine varie de 3% à 18% avec une valeur moyenne de 8%. (Figures 32 et 33). Pour un site contaminé donné, la bioaccessibilité de l'antimoine varie très peu en dépit de la diversité des sols. En effet, les valeurs de bioaccessibilité varient de 3% à 18% pour les 9 sols miniers et de 3% à 12% pour les 6 sols échantillonnés à proximité de la fonderie. Contrairement à l'arsenic, il n'y a pas un comportement différent de la bioaccessibilité de l'antimoine en fonction de la source de contamination (Test *U*, $p > 0,05$). Finalement, l'analyse de variance confirme qu'il n'y a pas de différence significative des valeurs de bioaccessibilité pour les deux phases digestives pour les 15 sols contaminés ($p > 0,05$).

Tableau 30 : Médianes des coefficients de variation de la bioaccessibilité obtenus pour les 4 contaminants au sein des 15 sols contaminés dans chacune des phases digestives du test UBM

		Médiane CV Bioacc * Pb (%)	Médiane CV Bioacc Cd (%)	Médiane CV Bioacc As (%)	Médiane CV Bioacc Sb (%)
15 sols	Phase gastrique	5,6	4,0	9,4	14,3
	Phase intestinale	7,1	7,5	10,0	16,4

* Médiane CV bioacc : Valeur de la médiane des coefficients de variation de la bioaccessibilité dans les 15 sols contaminés pour contaminant donné et dans chaque phase digestive

Tableau 31 : Valeurs des coefficients de variation obtenus pour des deux matériaux de référence (n=50)

		CV Bioacc * Pb (%)	CV Bioacc Cd (%)	CV Bioacc As (%)	CV Bioacc Sb (%)
SMR 2710	Phase gastrique	3,2	9,5	5,6	8,5
	Phase intestinale	2,8	5,5	5,5	11,0
SMR 2711	Phase gastrique	5,3	2,8	2,1	12,9
	Phase intestinale	7,0	9,9	5,0	17,1

* CV bioacc : Coefficient de variation de la bioaccessibilité pour chaque contaminant

III.) Discussion

Le tableau 30 regroupe les valeurs médianes de coefficient de variation au sein de chaque phase digestive pour chacun des contaminants présents dans les sols et le tableau 31 présente les valeurs de coefficient de variation dans les deux matériaux de référence. La plus grande variabilité obtenue pour l'antimoine peut s'expliquer par la très faible bioaccessibilité de ce contaminant pour l'ensemble des sols et par les faibles concentrations en antimoine dans la majorité des sols. Dans l'ensemble, les résultats de l'étude indiquent que le test *in vitro* UBM permet d'estimer rapidement et de façon répétable, pour un même opérateur, la bioaccessibilité du plomb, du cadmium, de l'arsenic et de l'antimoine des différents sols contaminés.

III.1) Variation de la bioaccessibilité des éléments métalliques dans les sols

La bioaccessibilité des éléments métalliques, déterminée par le test *in vitro* UBM, peut être inférieure à la concentration totale de ces contaminants dans les sols, en particulier pour l'arsenic et l'antimoine. Ceci confirme qu'en fonction des sols contaminés, seule une fraction de la concentration totale des contaminants est solubilisée et donc potentiellement disponible pour l'absorption.

Dans l'optique d'étudier les corrélations entre la biodisponibilité *in vivo* et la bioaccessibilité *in vitro*, l'intérêt de l'étude était de disposer de sols présentant différentes sources de contamination et des caractéristiques physico-chimiques contrastées afin d'obtenir une gamme de valeurs de bioaccessibilité la plus étendue possible pour chacun des contaminants. En cohérence avec les résultats de biodisponibilité relative obtenus dans le chapitre précédent, la diversité des sols utilisés a permis d'obtenir une gamme de bioaccessibilité relative étendue pour le plomb (de 10% à 82% ; moyenne = 48%), le cadmium (de 8% à 86% ; moyenne = 49%) et l'arsenic (de 4% à 71% ; moyenne = 23%). Pour l'antimoine, l'étendue de la gamme de la bioaccessibilité est très faible. En effet, pour les 15 sols étudiés, la bioaccessibilité de l'antimoine est inférieure à 18% (moyenne = 7%). Ainsi, la bioaccessibilité d'un contaminant donné est très variable entre les 15 sols échantillonnés, sauf pour l'antimoine.

La bioaccessibilité est également variable, entre les différents contaminants, pour un sol donné. Par exemple, le plomb et le cadmium, dans les sols étudiés, ont une bioaccessibilité

moyenne significativement plus importante que pour l'arsenic et l'antimoine. Navarro *et al.* (2006) montrent également que pour des sols échantillonnés sur un site minier (n=18) la bioaccessibilité est plus importante pour le cadmium (moyenne = 47%) et le plomb (moyenne = 26%) par rapport à la bioaccessibilité de l'arsenic (moyenne = 5%). Dans la littérature, la bioaccessibilité de l'arsenic est considérée comme étant plus faible et moins variable que la bioaccessibilité des éléments cationiques (Ruby *et al.*, 1999 ; Yang *et al.*, 2002 ; Navarro *et al.*, 2006) et celle-ci est généralement inférieure à 50% dans des sols aux historiques de contamination variés (Yang *et al.*, 2002 ; Lee *et al.*, 2005 ; Wragg, 2005 ; Juhasz *et al.*, 2007a). Il semblerait que les contaminants cationiques possèdent des caractéristiques très différentes dans les sols qui engendrent des valeurs de bioaccessibilité plus variables par rapport aux valeurs obtenues pour les métalloïdes étudiés. Plusieurs paramètres peuvent expliquer la variation ou non de la bioaccessibilité des contaminants métalliques dans les sols.

III.2) Le rôle des caractéristiques physico-chimiques et de la distribution des ETM sur les phases porteuses

Les résultats présentés au cours de ce chapitre ont montré pour le plomb, le cadmium et l'arsenic qu'il y avait un impact significatif de la source de contamination sur les valeurs de bioaccessibilité. Pour les sols des sites miniers (sites 1 et 2), des valeurs moyennes de bioaccessibilité significativement plus faibles ont été mesurées par rapport à celles estimées pour les sols ayant reçu des dépôts atmosphériques (site 3). De plus, dans le cadre de l'étude, il y a une nette différence des valeurs de bioaccessibilité de l'arsenic entre les deux historiques de contamination. En effet, pour les 9 sols miniers la bioaccessibilité de l'arsenic est inférieure à 12%. Ces observations sont en accord avec de nombreux résultats publiés dans la littérature. Plusieurs études ont mis en évidence la différence de bioaccessibilité des ETM obtenue par différents tests *in vitro* pour différents historiques de contamination (Freeman *et al.*, 1992; Ruby *et al.*, 1999 ; Schroder *et al.*, 2003 ; USEPA, 2004 ; Klinck *et al.*, 2005 ; Smith *et al.*, 2008 ; USEPA, 2007b). Cependant, il est difficile de généraliser ces données et d'extrapoler les résultats de bioaccessibilité d'un site à un autre présentant des sources de contamination identiques étant donné qu'au-delà de l'historique de contamination, de nombreux autres facteurs, spécifiques à chaque site et sol contaminé, peuvent influer sur la

bioaccessibilité des contaminants métalliques (Ruby *et al.*, 1999 ; Rieuwerts *et al.*, 2000 ; Reeder *et al.*, 2006).

Dans le cadre de l'étude, des valeurs de bioaccessibilité du plomb et du cadmium relativement importantes ont pu être mesurées pour des sols échantillonnées sur les sites miniers. Par exemple, pour le plomb au sein des sites miniers, la bioaccessibilité gastrique absolue ou relative est supérieure à 60% pour 3 sols sur les 9 étudiés. De même, pour le cadmium, 3 sols miniers possèdent une bioaccessibilité supérieures à 50%.

La différence de bioaccessibilité observée entre les deux types de contamination, minier (géochimique) et atmosphérique (anthropogénique), est liée à la diversité des distributions entre les phases porteuses et les contaminants (Davis *et al.*, 1993 ; Hamel *et al.*, 1998 ; Ruby *et al.*, 1999 ; Romero *et al.*, 2007). En effet, de manière générale dans la littérature, il est montré que pour une contamination de type « géochimique », les éléments métalliques vont se trouver sous des formes moins extractibles et par conséquent ils seront potentiellement moins bioaccessibles que les formes de contaminants présents dans les sols de types anthropogéniques (Rieuwerts *et al.*, 2000 ; Adamo *et al.*, 2002 ; Gron *et al.*, 2003 ; Ng *et al.*, 2003 ; Cave *et al.*, 2004 ; Ljung, 2006). Ces observations sont concordantes avec les résultats obtenus par les extractions séquentielles et présentés dans le chapitre 2. Par conséquent, il est difficile de dissocier l'influence de l'historique de contamination sur la variation de la bioaccessibilité de celui de la distribution des ETM sur les phases porteuses. De ce fait, il semble qu'indépendamment de l'historique de contamination se sont les caractéristiques du sol qui vont régir la bioaccessibilité des ETM.

De nombreux facteurs sont généralement cités dans la littérature comme pouvant influer sur les valeurs de bioaccessibilité des contaminants métalliques : les propriétés physico-chimiques des sols (CEC, argiles, carbonates, concentrations en fer, matières organiques) et la distribution géochimique des éléments métalliques dans les sols (Davis *et al.*, 1993 ; Rieuwerts *et al.*, 1995, 1998 ; Ruby *et al.*, 1999 ; Datta *et al.*, 2005 ; Girouard *et al.*, 2009). De ce fait, des analyses de corrélation (Pearson) et analyses en composante principale ont été effectuées afin de mettre en évidence le potentiel impact de la distribution des ETM sur les phases porteuses et des paramètres physico-chimiques sur la bioaccessibilité des contaminants dans les sols. Ces résultats sont présentés par contaminant et discutés par rapport aux données de la littérature.

- Pour le plomb :

Premièrement, pour le plomb, différents paramètres physico-chimiques du sol sont cités comme influençant sa mobilité et potentiellement sa bioaccessibilité : le pH, la texture du sol (surtout la teneur en argile), la teneur en matière organique, la CEC et la présence d'éléments pouvant adsorber le plomb dans les sols (Fe, P, Mn) (Alloway, 1995 ; Ruby *et al.*, 1999 ; Rieuwerts *et al.*, 2000). Par exemple, certaines études ont mis en évidence la corrélation entre la mobilité du plomb et le pH du sol (Ruby *et al.*, 1996 ; Kabata-Pendias et Pendias, 1999 ; Navarro *et al.*, 2006). De nombreux travaux mettent clairement en évidence le rôle important de la fraction argileuse ou de la matière organique sur l'adsorption du plomb dans les sols (Das *et al.*, 1993 ; Li et Li, 2000). Les processus mis en jeu sont des réactions d'échanges ioniques par remplacement du calcium et potassium par le plomb (Bittel et Miller, 1974) et la formation de complexes de sphère interne avec les atomes d'oxygène des groupes fonctionnels des substances humiques (Yong *et al.*, 1992).
Poggio *et al.* (2009) réalisent le lien entre ces paramètres du sol et le plomb bioaccessible par le biais d'une régression linéaire multiple. Ils montrent ainsi que la bioaccessibilité du plomb est fonction de la matière organique, du pourcentage d'argile et de la concentration totale en plomb dans les sols (r^2 = 0,53 ; n=56, p < 0,05). Cependant, dans cette étude les auteurs indiquent que le modèle développé n'est valable que pour les sols de l'étude et que pour valider ce modèle de prédiction il sera nécessaire d'étudier d'autres sols provenant d'autres sites et présentant des caractéristiques différentes. Dans le cadre de l'étude, les résultats du Tableau 32 mettent en évidence qu'il n'y a pas de corrélations significatives pour l'ensemble des paramètres physico-chimiques étudiés et la bioaccessibilité gastrique absolue pour les 15 sols. Ces résultats montrent que pour les sols étudiés, il n'est pas possible de développer un modèle de prédiction robuste au contraire de l'étude de Poggio *et al.* (2009). Wong *et al.* (2006) montrent également qu'il n'y a pas de corrélations entre le plomb bioaccessible pour 12 sols échantillonnés à proximité d'un réseau routier et les caractéristiques physico-chimiques des sols (pH, texture, matière organique).

Un autre paramètre majeur pouvant expliquer les variations de bioaccessibilité des ETM dans les sols est la distribution géochimique des contaminants sur les phases porteuses. En effet, le plomb présente une forte réactivité avec la matière organique et différents ions (phosphates, chlorures, oxy-hydroxydes métalliques…) lui permettant de former des complexes plus ou

Tableau 32 : Matrice de corrélation Pearson entre la bioaccessibillité du plomb, les paramètres du sol et les extractions séquentielles

	Argiles	MO	Calcaire total	CEC	pH	[Fe]	[P]	[Mn]	
Bioacc Pb (%)	0,36	-0,04	-0,25	0,44	-0,10	-0,43	0,09	-0,23	

	soluble	échangeable	acido-soluble	ox-Mn	ox-Fer amorph	ox-Fer crist	sulfures	MO	résiduelle
Bioacc Pb (%)	0,47	**0,74**	**0,80**	0,14	-0,10	**-0,69**	**0,87**	0,17	**-0,82**

En gras, valeurs significatives au seuil α=0,05

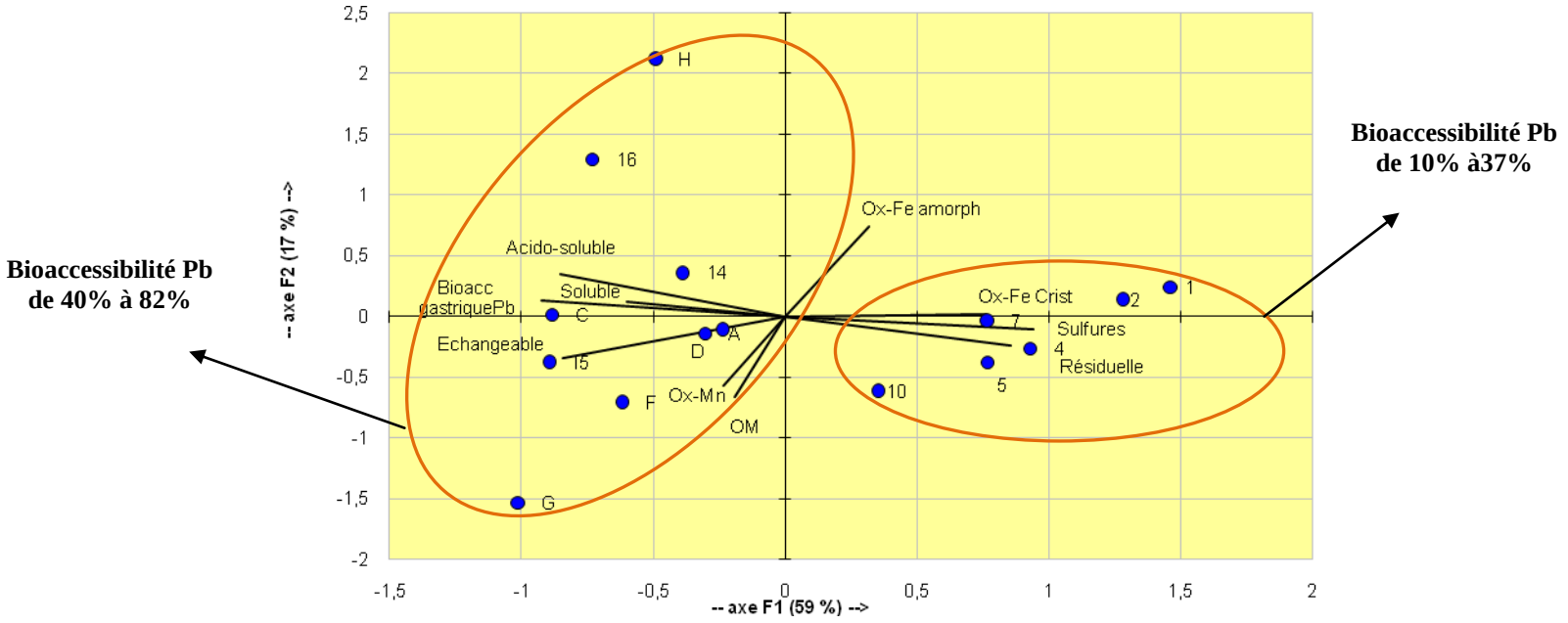


Figure 34 : Résultats de l'analyse en composante principale entre le plomb bioaccessible (%) et les extractions séquentielles

moins stables dans le sol (Alloway, 1995 ; Ruby *et al.*, 1999). Par conséquent, le plomb dans les sols peut se trouver sous une grande diversité de formes et toutes ses formes vont se comporter de façon différentes dans le lumen gastro-intestinal. Ainsi, suite à l'ingestion de terre, ses formes pourront être plus ou moins solubilisées dans le tractus gastro-intestinal (Ruby *et al.*, 1996). En effet, Ruby *et al.* (1999) affirment que la biodisponibilité et la bioaccessibilité des contaminants inorganiques dans les sols sont une fonction de la spéciation et de l'encapsulation des phases minéralogiques au sein de la matrice sol. Ruby *et al.* (1999) et Bosso *et al.* (2007) montrent que les sols qui produisent les valeurs de biodisponibilité et de bioaccessibilité les plus faibles sont des sites pour lesquels le plomb est sous forme de sulfures de plomb. Au contraire, les sols qui produisent les plus fortes valeurs de biodisponibilité sont les sites pour lesquels le plomb est principalement associé aux oxydes de fer et de manganèse et également présent sous forme de carbonates de plomb. Ces résultats sont confirmés par l'étude de Marshner *et al.* (2006) qui démontrent qu'il y a une corrélation entre le plomb biodisponible et bioaccessible et le plomb extrait des oxy-hydroxydes de manganèse et montrent ainsi que cette phase est relativement bioaccessible et biodisponible. De plus, l'étude de Frau *et al.* (2008), montre par le biais d'extractions séquentielles, que le plomb est très peu bioaccessible dans 25 sols miniers et qu'il est principalement extrait des phases associées aux sulfures et aux composés présents dans la fraction résiduelle.

Le tableau 32 confirme, une partie de ces résultats, en présentant les corrélations entre le plomb bioaccessible et le plomb extrait au sein des différentes phases d'extractions séquentielles. En effet, il y a une corrélation significative et positive entre le plomb bioaccessible (%) et le plomb extrait au sein des phases échangeable et acido-soluble (carbonates) ($p < 0,05$). De même, il y a une corrélation significative et négative entre le plomb bioaccessible et le plomb extrait au sein de la phase oxydes de fer cristallin et des fractions sulfure et résiduelle ($p < 0,05$).

La figure 34 présente les résultats de l'analyse en composante principale et confirme que la bioaccessibilité du plomb dans les sols se distribue en fonction des phases porteuses sur lesquelles le plomb est sorbé. Ainsi, à l'inverse des paramètres physico-chimiques, la distribution de l'élément au sein des phases porteuses permet d'expliquer en partie la variation de la bioaccessibilité du plomb dans les sols et la majorité des données obtenues dans la littérature sont cohérentes avec nos résultats.

Tableau 33 : Matrice de corrélation Pearson entre bioaccessibillité du cadmium, les paramètres du sol et les extractions séquentielles

	Argiles	MO	Calcaire total	CEC	pH	[Fe]	[P]	[Mn]
Bioacc Cd (%)	0,45	0,36	-0,18	0,49	0,07	-0,46	0,12	0,26

	soluble	échangeable	acido-soluble	ox-Mn	ox-Fer amorph	ox-Fer crist	sulfures	MO	résiduelle
Bioacc Cd (%)	**0,79**	**0,78**	**0,86**	-0,04	0,10	**-0,59**	**-0,89**	-0,30	**-0,81**

En gras, valeurs significatives au seuil α=0,05

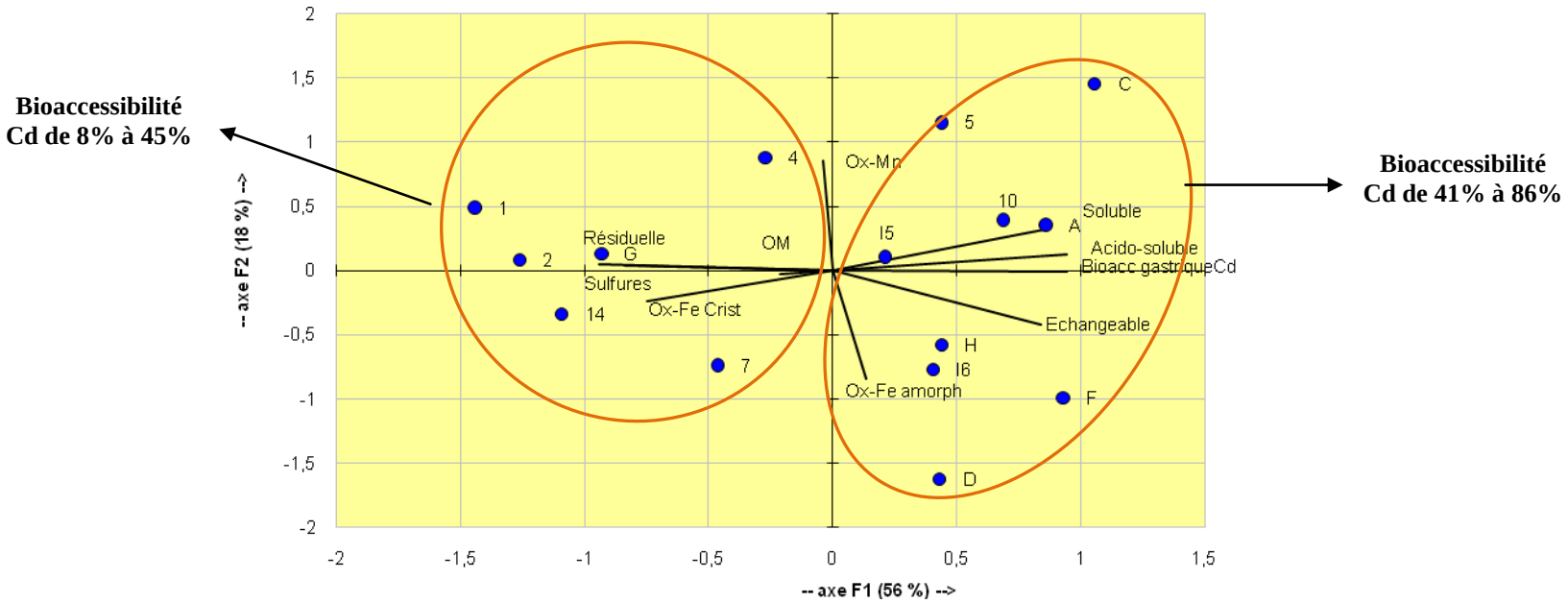


Figure 35 : Résultats de l'analyse en composante principale entre cadmium bioaccessible (%) et les extractions séquentielles

- Pour le cadmium :

Le comportement du cadmium dans les sols est souvent cité comme étant similiaire à celui du plomb (Santillan et Jurinak, 1975 ; Alloway 1995 ; McBride, 1997). Plusieurs études ont mis en évidence le rôle de la matière organique et des argiles (par ordre croissant d'affinité kaolinite < illite < smectite) sur la réduction de la mobilité du cadmium (McBride, 1997). Cependant, à notre connaissance, peu d'études ont montré une corrélation entre ces paramètres et la bioaccessibilité du cadmium dans les sols. Dans le cadre de l'étude, le Tableau 33 montre qu'il n'y a pas de corrélations significatives pour l'ensemble des paramètres physico-chimiques étudiés et la bioaccessibilité du cadmium pour les 15 sols.

Le cadmium présente une affinité pour les oxyhydroxydes de fer. La co-précipitation du cadmium avec les oxy-hydroxydes de fer à la surface du sol se présente fréquemment et résulte ainsi à la formation de précipités de solubilité très variables (Hickey et Kittrick, 1984). De plus, sous certaines conditions physico-chimiques (pH, Eh réducteur, nature de la matière organique, constantes de complexation) le cadmium peut être complexé de manière préférentielle à la matière organique (Alloway, 1995 ; McBride *et al.*, 1997 ; Citeau *et al*., 2003). Cependant, Mcbride (1980) et Martin-Garin (2000) ont montré que les carbonates constituaient une phase de sorption dominante contrôlant ainsi la distribution du cadmium et sa mobilité dans les sols.

Les résultats d'extractions séquentielles montrent que le cadmium est principalement extrait de la phase acido-soluble c'est-à-dire majortitairement des carbonates. Le tableau 33 regroupe les résultats des corrélations entre les phases porteuses du cadmium et sa bioaccessibilité dans les 15 sols. La bioaccessibilité du cadmium dans les sols est conditionnée par le cadmium extrait de la phase acido-soluble, c'est-à-dire des carbonates ($p<0,05$). De même, il y a également une relation significative et positive entre la bioaccessibilité et le cadmium extrait au sein des phases soluble et échangeable ($p<0,05$). Par contre, les phases oxydes de fer cristallins, sulfures et la fraction résiduelle sont corrélées significativement aux valeurs les plus faibles de bioaccessibilité du cadmium dans les sols. Les corrélations obtenues entre les phases porteuses et la bioaccessibilité sont quasiment les mêmes que celles obtenues pour le plomb, ce qui conforte le fait que ces deux cations divalents ont un comportement similaire dans les sols.

Tableau 34 : Principaux modèles de prédiction de la bioaccessibilité de l'arsenic obtenus à partir des paramètres physico-chimiques du sol

Bioaccessibilité As = 67,85 + 0,409 [As] totale – 4,759 [Fe] totale	R^2 = 0,95; n = 50	Juhasz *et al.*, 2007
Bioccessibilité As = 11,3 pH – 30,5 log [Fe] totale	R^2 = 0,74; n = 36	Yang *et al.*, 2002
Bioaccessibilité As = 7,25 pH + 0,158 [As] totale	R^2 = 0,79; n = 5	Tang *et al.*, 2007
Bioccessibilité As = 250,9 + 0,15 [P] – 3,36 Argile – 40,5 pH – 0,34 CEC + 0,066 Total (Ca +Mg)	R^2 = 0,85; n = 12	Sarkar *et al.*, 2007a
Bioaccessibilité As = 457 + 0,14 [As] totale – 9,57 [Fe] totale	R^2 = 0,92; n = 21	Klinck *et al.*, 2005

Tableau 35 : Résultats matrice de corrélation Pearson entre la bioaccessibillité de l'arsenic, les paramètres du sol et les extractions séquentielles

	Argiles	**MO**	**Calcaire total**	**CEC**	**pH**	**[Fe]**	**[P]**	**[Mn]**	
Bioacc As (%)	**0,83**	0,28	-0,36	**0,56**	0,11	-0,54	**0,86**	-0,11	

	soluble	**échangeable**	**acido-soluble**	**ox-Mn**	**ox-Fer amorph**	**ox-Fer crist**	**sulfures**	**MO**	**résiduelle**
Bioacc As (%)	**0,85**	**0,81**	**0,74**	-0,33	0,22	-0,39	0,13	-0,47	**-0,65**

En gras, valeurs significatives au seuil α=0,05

Finalement, la figure 35 montre que la distribution du cadmium sur les phases porteuses permet d'expliquer la variation de la bioaccessibilité de cet élément au sein des 15 sols.

- Pour l'arsenic :

Les relations entre les paramètres physico-chimiques du sol et la bioaccessibilité de l'arsenic ont été détaillées ces dernières années dans de nombreuses études (Yang *et al.*, 2002 ; Klinck *et al.*, 2005 ; Sarkar *et al.*, 2007a ; Juhasz *et al.*, 2007a ; Tang *et al.*, 2007). Ainsi, le tableau 34 regroupe les principaux modèles de prédiction obtenus à partir de régressions linéaires multiples. Ces modèles mettent en évidence l'impact significatif de plusieurs paramètres du sol sur la bioaccessibilité de l'arsenic comme : la concentration totale en fer, la concentration totale en arsenic, la concentration totale en phosphore, la CEC, la teneur en argile ou encore le pH. Le tableau 35 présente les résultats de corrélation pour les données obtenues au cours de l'étude. Ces résultats confirment l'impact potentiel de la teneur en argile, de la capacité d'échange cationique et du phosphore sur la bioaccessibilité de l'arsenic dans les sols ($p < 0,05$). Cependant, comme précédemment pour le plomb, Juhasz *et al.* (2007a) indiquent que les analyses statistiques des résidus du modèle de prédiction montrent que celui-ci n'est pas robuste, c'est-à-dire valable pour un site donné mais non extrapolable à l'ensemble des sites contaminés. Pour le vérifier, les différents modèles présentés au sein du tableau 34 ont été appliqués avec les données de l'étude et quel que soit le modèle utilisé, le coefficient de détermination obtenu est très faible et non significatif ($p>0,05$).

Ainsi, en dépit de l'importance de ces paramètres physico-chimiques dans le contrôle de la sorption de l'arsenic qui a été démontrée par un nombre important de recherche (Smith *et al.*, 1998 ; Goldberg, 2002 ; Yang *et al.*, 2002 ; Tang *et al.*, 2007), il est évident que d'autres variables telles que la spéciation, la minéralogie (encapsulation des contaminants dans des phases insolubles), et le temps de contact avec le sol influenceront la bioaccessibilité de l'arsenic dans les sols (Ruby *et al.*, 1999 ; Cave *et al.*, 2003 ; Juhasz *et al.*, 2007a ; Juhasz *et al.*, 2008).

Parmi les phases minérales susceptibles de sorber l'arsenic, les oxy-hydroxydes métalliques (Fe, Al, Mn) sont généralement cités dans la littérature (Bowell, 1994 ; Manning et Golberg, 1997 ; Cave *et al.*, 2003 ; Wragg *et al.*, 2007 ; Gal *et al.*, 2007 ; Smith *et al.*, 2008). Les résultats des extrations séquentielles montrent en effet que les oxy-hydroxydes de fer (amorphes et critallins) et la fraction résiduelle, qui se composent principalement de phases

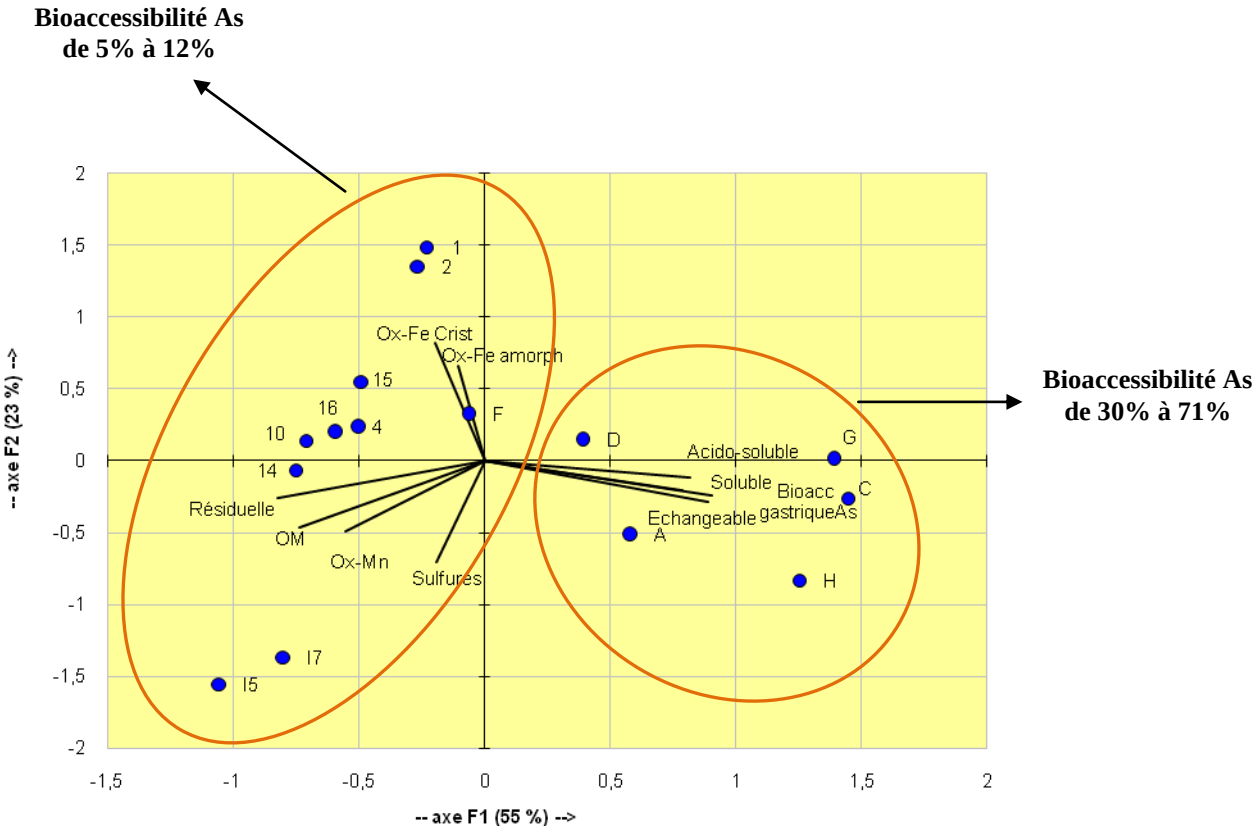


Figure 36 : Résultats de l'analyse en composante principale entre l'arsenic bioaccessible (%) et les extractions séquentielles

silicatées ou alumino-silicatées, sont les principales phases porteuses de l'arsenic pour les sols miniers. Pour les sols de fonderie, les oxy-hydroxydes de fer sont également une phase porteuse importante mais une augmentation significative de l'arsenic extrait au sein des phases soluble, échangeable et acido-soluble est obsevée.

Plusieurs études ont démontré que les sols pour lesquels l'arsenic était faiblement bioaccessible sont les sols dans lesquels le métalloïde est lié à des phases du type oxy-hydroxydes de fer cristallins et au sein des sulfures (Klinck *et al.*, 2005 ; Tang *et al.*, 2007 ; Smith *et al.*, 2008).

Une étude réalisée par le BGS (Klinck *et al.*, 2005) montre que la valeur moyenne de la bioaccessibilité de l'arsenic au sein de 20 résidus miniers (scories) est de 11,2% pour une valeur moyenne en concentration totale de 19170 $mg.kg^{-1}$. Pour la même étude, 73 sols échantillonnés au sein du site minier présentent une valeur moyenne de bioaccessibilité de 15,9% pour une concentration moyenne de 8081 $mg.kg^{-1}$. Les auteurs expliquent la faible variation de bioaccessibilité par le fait que l'arsenic total est corrélé aux concentrations du fer et du soufre, suggérant la présence d'arsénopyrite (FeAsS) dans ces différents sols et que cette forme est faiblement bioaccessible (Klinck *et al.*, 2005). Au cours de cette même étude, des analyses en microscopie électronique ont permis de mettre en évidence des associations entre le calcium et l'arsenic (arséniate de calcium amorphe) pour les sols présentant des valeurs de bioaccessibilité de l'arsenic les plus importantes (Klinck *et al.*, 2005).

Le tableau 35 indique les résultats des corrélations entre les différentes phases porteuses et l'arsenic bioaccessible dans les 15 sols. Une corrélation significative et positive est obtenue entre les phases échangeable et acido-soluble (carbonates) et l'arsenic bioaccessible. Au contraire, la fraction résiduelle est corrélée négativement à la bioaccessibilité de l'arsenic ($p < 0,05$). Ces résultats confirment les données de la littérature et montrent que la bioaccessibilité de l'arsenic sera régie par la présence de l'élément dans les phases échangeable et acido-soluble (Smith *et al.*, 2008). Même si les oxy-hydroxydes de fer sont les principales phases porteuses de l'arsenic pour l'ensemble des sols, il n'est pas possible d'expliquer la variation de la bioaccessibilité dans les sols uniquement par cette association. Wragg (2005) montre également qu'il n'y a pas de corrélation entre l'arsenic bioaccessible et les concentrations en fer et affirme que d'autres phases que les oxy-hydroxydes de fer conditionnent la bioaccessibilité de l'arsenic dans les sols.

Finalement, la figure 36 confirme que la distribution de l'arsenic sur les phases porteuse du sol permettent de distinguer les sols miniers et de fonderie en fonction de leur bioaccessibilité.

Les résultats montrent ainsi que l'arsenic bioaccessible est principalement lié aux phases soluble, échangeable et carbonatée.

- ***Pour l'antimoine :***

Pour l'antimoine, la bioaccessibilité est très faible quelle que soit la nature de la contamination des sols. Pour ce métalloïde, à notre connaissance, seule une étude que nous avons développée fournit des données de bioaccessibilité. Cette étude montre, par le biais du test UBM, que la bioaccessibilité de l'antimoine dans quatre sols miniers (site différent de ceux utilisés au sein de la thèse) variait de 1,5% à 12% (Denys *et al.*, 2008). Ainsi, ces résultats confirment la faible bioaccessibilité de l'antimoine dans des sols miniers.
En raison de la très faible variation de la bioaccessibilité de l'antimoine dans les sols, il n'est pas possible d'expliquer une variation de celle-ci par le biais des paramètres physico-chimiques (Tableau 36). Par contre, cette faible variation dans l'ensemble des sols peut s'expliquer par le fait que l'antimoine est majoritairement lié, pour l'ensemble des sols étudiés, à des phases porteuses du type oxy-hydroxydes de fer, sulfures et ainsi que dans les constituants réfractaires de la fraction résiduelle (Tableau 36). L'ensemble des études portant sur la distribution et la mobilité de l'antimoine dans les sols confirme que le fer et les composés réfractaires (silice et aluminium) sont les principaux éléments adsorbants pour l'antimoine (Blay, 2000 ; Jonhson *et al.*, 2005 ; Gal *et al.*, 2007). Gal *et al.* (2006) qui utilisent des sols échantillonnés sur le même site contaminé (site 1 de l'étude : site minier de Glendinning) démontrent par le biais d'analyses en Diffraction des Rayons X que l'antimoine est lié à des formes de minéraux riches en fer du type goethite et/ou hématite[13]. De plus, les résultats de spéciation obtenus pour les 15 sols, sont confirmés par l'étude de Denys *et al.* (2008) qui montrent que pour 4 sols miniers dans lesquels l'antimoine est faiblement bioaccessible, ce métalloïde est lié aux oxy-hydroxydes de fer et à la fraction résiduelle. De même, Jonhson *et al.* (2005), à l'aide d'extractions séquentielles, montrent que plus de 90% de l'antimoine extrait était lié aux oxydes de fer cristallins et amorphes (Jonhson *et al.*, 2005). Finalement, des mesures EXAFS de sols provenant de champs de tirs et de sols minier fournissent l'évidence de la forte préférence de la liaison de l'antimoine aux oxy-hydroxydes de fer (Takaoka *et al.*, 2005 ; Scheinost *et al.*, 2006). L'ensemble de ces études,

[13] La **goethite** est un minéral, oxy-hydroxyde de fer trivalent, polymorphe α du composé FeO(OH).
L'**hématite**, ou **oligiste**, est un minéral composé d'oxyde de fer III de formule Fe_2O_3.

Tableau 36 : Résultats de la matrice de corrélation Pearson entre bioaccessibillité de l'antimoine, paramètres du sol et extractions séquentielles

	Argiles	**MO**	**Calcaire total**	**CEC**	**pH**	**[Fe]**	**[P]**	**[Mn]**	
Bioacc Sb (%)	-0,20	-0,07	0,12	-0,18	0,23	0,45	-0,17	0,12	
	soluble	**échangeable**	**acido-soluble**	**ox-Mn**	**ox-Fer amorph**	**ox-Fer crist**	**sulfures**	**MO**	**résiduelle**
Bioacc Sb (%)	0,08	0,12	0,21	-0,11	-0,15	-0,45	-0,56	0,23	-0,39

En gras, valeurs significatives au seuil α=0,05

regroupant une diversité de sol et d'historique de contamination, confirme que l'antimoine est majoritairement associé aux oxy-hydroxydes de fer et aux matériaux réfractaires des sols ce qui peut expliquer la faible bioaccessibilité de l'antimoine pour les sols étudiés.

III.3) Comportement spécifique des contaminants au sein des différentes phases digestives du test UBM

Les résultats de l'étude de bioaccessibilité montrent qu'il y a un comportement différent des contaminants, cationique et anionique, au sein des deux phases digestives du test UBM. En effet, pour le plomb et le cadmium, à la fois pour les formes de référence et pour les sols, il y a une diminution significative de la bioaccessibilité dans la phase intestinale. Des résultats identiques à ceux de l'étude ont été obtenus par le RIVM (en utilisant le test RIVM) pour l'acétate de plomb (phase gastrique, bioaccessibilité : 91% ± 3% et dans la phase intestinale, bioaccessibilité : 66 ± 2%) (Oomen *et al.*, 2006). Juhasz *et al.* (2009), basé sur le test PBET, étudient l'effet de la remontée du pH sur la bioaccessibilité de l'acétate de plomb. Ils montrent ainsi que sur une gamme de pH de 1,5 à 4,0 l'acétate de plomb est 100% bioaccessible. Lorsque le pH est supérieur à 5,5 la bioaccessibilité de l'acétate de plomb diminue fortement. Par exemple, si le pH est d'environ 7,0 la bioaccessibilité de l'acétate de plomb est d'environ 20% (Juhasz *et al.*, 2009). De même, de nombreux tests *in vitro* publiés, mettant en œuvre une phase intestinale, font état d'une diminution de la bioaccessibilité des contaminants cationiques présents dans les sols (Pb et Cd) au sein de cette phase (Rodriguez et Basta, 1999 ; Schroder *et al.*, 2003 ; Bosso *et al.*, 2007 ; Juhasz *et al.*, 2009).

Au contraire, les résultats de l'étude montrent pour les éléments anioniques (As et Sb), à la fois pour les formes de référence et pour les 15 sols, qu'il n'y a pas de différence significative entre les bioaccessibilités gastrique et gastro-intestinale. Oomen *et al.* (2006) indiquent également que la bioaccessibilité de l'arséniate de sodium, déterminée par le test RIVM, est de 91% dans la phase gastrique et 88% dans la phase intestinale. De plus, la majorité des études de la littérature montre qu'il n'y a pas de diminution ou alors très faible de la bioaccessibilité gastro-intestinale pour l'arsenic et l'antimoine (Basta *et al.*, 2007 ; Palumboe-Roe *et al.*, 2007 ; Denys *et al.*, 2008). Ainsi, ces différents résultats confirment que la phase gastrique conditionne la solubilisation des ETM et permet d'obtenir la bioaccessibilité maximale pour chaque contaminant dans l'ensemble des sols (Ruby *et al.*, 1999 ; Oomen *et al.*, 2006).

La diminution de bioaccessibilité observée pour les cations divalents au sein de la phase intestinale est liée majoritairement à l'augmentation du pH qui peut provoquer une précipitation et une complexation d'une partie des cations précédemment solubilisés dans l'estomac (Ruby *et al.*, 1999 ; Oomen *et al.*, 2003 ; Oomen *et al.*, 2006). En effet, plusieurs études ont montré que le plomb était capable de se réadsorber sur les particules du sol et/ou de se complexer avec différents composés pour former des complexes inorganiques (phosphates, chlorures) ou organiques (avec les sels biliaires) (Gron *et al.*, 2003 ; Oomen *et al.*, 2003 ; Marshner *et al.*, 2006). Contrairement aux cations divalents, la bioaccessibilité de l'arsenic et de l'antimoine n'est pas aussi sensible à l'augmentation du pH au sein de la phase intestinale (Ruby *et al.*, 1996).

Cependant, les résultats de l'étude montrent que la diminution de la bioaccessibilité entre les deux phases digestives du test UBM n'est pas simplement dépendante de la remontée du pH. En effet, pour les formes de référence du plomb et du cadmium, la diminution de la bioaccessibilité est d'environ de 30 points. Or pour les 15 sols, la bioaccessibilité du plomb diminue de 2 à 41 points entre les deux phases digestives du test UBM et celle du cadmium entre 3 et 32 points. Ainsi, en fonction des sols, le pourcentage de diminution de la bioaccessibilité absolue des éléments cationiques au sein de la phase intestinale est différent. Ces différences peuvent être liées aux caractéristiques des sols et plus particulièrement à la présence ou non d'agent complexant qui peuvent réadsorber ou reprécipiter le plomb ou le cadmium libéré au sein de la phase gastrique (Oomen *et al.*, 2003 ; Juhasz *et al.*, 2009). Des études de corrélation ont été réalisées entre les données de bioaccessibilité et les caractéristiques des sols, présentées dans le chapitre 2, mais aucun paramètre n'a permis d'expliquer significativement la différence de réduction de bioaccessibilité au sein de la phase intestinale pour les 15 sols ($p > 0,05$).

En terme de bioaccessibilité relative, les résultats montrent des différences moindres entre les fractions bioaccessibles des phases gastriques et gastro-intestinales. En particulier, quel que soit le contaminant considéré, il n'y a pas, dans la majorité des cas, de différences significatives de bioaccessibilité entre les deux phases digestives pour les 15 sols. Ainsi, dans l'optique d'utiliser la bioaccessibilité en évaluation des risques, en relatif la phase gastrique ou gastro-intestinal donneront pour un contaminant donné les mêmes valeurs.

IV.) Conclusion

La bioaccessibilité des contaminants dans les 15 sols et dans les deux matériaux de référence est très variable, mis à part pour l'antimoine. Les résultats montrent que la bioaccessibilité des contaminants métalliques dans les sols est un phénomène complexe et régie par de nombreux facteurs spécifiques à chaque site contaminé et à chaque sol. Les résultats discutés ci-dessus montrent qu'il est difficile de prédire la bioaccessibilité des contaminants pour l'ensemble des sites contaminés à partir des paramètres physico-chimiques des sols. En effet, plusieurs études ont obtenu des modèles de prédiction significatifs mais ces modèles ne sont pas transposables d'un site contaminé à un autre. Par contre, la distribution des contaminants au sein des différentes phases porteuses est un paramètre plus robuste que les paramètres physico-chimiques pour expliquer la variation de la bioaccessibilité dans les sols. Ceci peut s'expliquer par le fait que la distribution géochimique dépend et englobe de nombreux paramètres et notamment des paramètres physico-chimiques des sols (Sposito, 1989 ; Ruby *et al.*, 1999 ; Reeder *et al.*, 2006).

La variation de la bioaccessibilité des ETM observée dans les différents sols renforce l'importance d'avoir un test rapide, peu coûteux, unique pour estimer la bioaccessibilité. Toutefois, avant d'envisager une application large du test UBM il est primordial de confirmer que la bioaccessibilité est un bon estimateur de la biodisponibilité relative en étudiant le lien entre ces deux paramètres.

Chapitre 5

Etude de la validation du modèle *in vitro* UBM

La validation physiologique du test UBM est une étape primordiale pour une utilisation large de ce protocole en évaluation des risques. Cette validation consiste à démontrer que la concentration d'un élément dans l'organisme est significativement corrélée à sa bioaccessibilité. En d'autres termes, il convient de vérifier que la bioaccessibilité est une étape limitante dans l'effet de la matrice sol sur la variation de la biodisponibilité.

I.) La démarche utilisée pour corréler biodisponibilité *in vivo* et bioaccessibilité *in vitro*

Pour vérifier que les variations de biodisponibilité des ETM dans les sols peuvent être expliquées par les variations de bioaccessibilité, il convient d'étudier les corrélations *in vivo/in vitro* (CIVIV) pour chaque contaminant.

I.1) Détermination des corrélations entre biodisponibilité relative et bioaccessibilité relative

Dans la littérature, la corrélation entre les deux paramètres est généralement effectuée par des régressions linéaires. En effet, si au sein de la matrice sol, un contaminant doit être bioaccessible pour être biodisponible alors une corrélation linéaire entre les deux notions doit être obtenue (Gron, 2005 ; Drexler *et al.*, 2007). Cependant, au contraire de la majorité des études développant des corrélations *in vivo*/*in vitro*, la démarche sera de comparer la biodisponibilité relative (%) à la bioaccessibilité relative (%) et non pas la biodisponibilité relative (%) à la bioaccessibilité absolue (%).

De plus, avant d'entreprendre les corrélations, la procédure procreg (procédure régression) du logiciel SAS a été utilisée afin de vérifier que les données répondent

significativement à un modèle linéaire ($p<0,05$) et non pas à un modèle quadratique ($p>0,05$).

Suite à la vérification de la linéarité de chaque corrélation, un logiciel développé par the Royal Society of Chemistry a été utilisé (Royal Society of Chemistry, 2002). **Le logiciel FREML (Functional Relationship Estimation by Maximum Likelihooh) permet de prendre en compte à la fois la variabilité sur l'axe des abscisses et sur l'axe des ordonnées** contrairement à un modèle de régression simple utilisant la technique des moindres carrés qui ne prend en compte que l'erreur sur l'axe des ordonnées (Royal Society of Chemistry, 2002). En effet, dans le cadre des corrélations biodisponibilité-bioaccessibilité, il y a une incertitude sur chaque axe. L'écart-type qui sera utilisé pour les valeurs de bioaccessibilité *in vitro* correspondra à l'écart-type obtenu à partir des cinq réplicats pour chacun des sols. Pour les données de biodisponibilité relative, l'écart-type correspondra à la moitié de l'intervalle de confiance entre la valeur de biodisponibilité relative maximale obtenue pour l'incertitude à 95% et la valeur de biodisponibilité relative calculée dans un compartiment cible donné (Oomen *et al.*, 2006 ; USEPA, 2007b).

La démarche statistique utilisée par le logiciel FREML permet d'estimer la pente (a) et l'ordonnée à l'origine (b) de la meilleure droite d'ajustement et les écarts-types (ET) associés à ces deux valeurs pour chacune des corrélations. Finalement, le coefficient de détermination (r^2) et l'écart type résiduel (ETR) de la meilleure droite d'ajustement sont également déterminés.

I.2) Détermination de critères d'acceptabilité

Suite à l'obtention de ces corrélations, se posent les questions suivantes : quels critères peuvent être développés afin de démontrer que la bioaccessibilité relative est l'étape limitante de la biodisponibilité relative?

La majorité des études de corrélation *in vivo/in vitro*, se base simplement sur la valeur obtenue pour le coefficient de détermination. Cependant, certains modèles peuvent être considérés comme valides car corrélés aux données *in vivo* alors qu'ils fournissent, par exemple, des valeurs de bioaccessibilité largement inférieures aux valeurs de biodisponibilité relative (Schroder *et al.*, 2004). Ainsi, il est important de définir si la corrélation entre les données permet de valider le test UBM avant de conclure en sa possible utilisation pour estimer la biodisponibilité relative. Pour cela, plusieurs critères peuvent être étudiés. Ils peuvent se répartir en deux catégories :

I.2.1) Critères de qualité de la corrélation

Les premiers critères à respecter seront des critères permettant de juger de la qualité de la corrélation :

- Comme pour toute régression linéaire, le premier paramètre important à évaluer sera **la valeur du coefficient de détermination r^2**. La valeur de ce coefficient dépendra du nombre de sol utilisé. Il est donc important de tester sa significativité. Pour la validation du test SBRC par les données *in vivo* (19 sols), Drexler *et al.* (2007) estiment **que le coefficient de détermination doit être au minimum de 0,6**. Par conséquent, cette valeur peut être retenue comme la valeur limite pour accepter la corrélation entre bioaccessibilité relative et biodisponibilité relative.

- Pour avoir une corrélation robuste entre les deux paramètres, il sera important que la corrélation soit obtenue pour une gamme de valeurs la plus étendue possible, c'est-à-dire une variation d'au moins de 70 à 80% de la gamme. De plus, ces valeurs doivent être correctement réparties sur la totalité de la droite de corrélation.

Ces critères sont donc basés sur des données statistiques permettant de mettre en évidence la qualité de la régression. Cependant, au-delà de la significativité du coefficient de corrélation et de la qualité de la régression, il est important de définir les paramètres du modèle de corrélation en se basant sur les relations entre bioaccessibilité et biodisponibilité.

I.2.2) Critères du modèle de corrélation

Pour chaque corrélation, la meilleure droite d'ajustement des données sera déterminée par le biais du logiciel FREML. Elle se caractérisera par une valeur de pente spécifique (a) et une valeur spécifique d'ordonnée à l'origine (b). En étudiant le lien entre bioaccessibilité relative et biodisponibilité relative, il est possible de fixer un ou plusieurs critère(s) qui permettront de valider ou non le fait que la bioaccessibilité est un estimateur pertiment de la biodisponibilité :

$$\text{Pente corrélation} = \frac{\text{Y (bioaccessibilité relative)}}{\text{X (biodisponibilité relative)}} = \frac{\dfrac{\text{Fraction bioaccessible } \textit{in vitro}_{(sol)}}{\text{Fraction bioaccessible } \textit{in vitro}_{(ref)}}}{\dfrac{\text{Fraction bioaccessible } \textit{in vivo}_{(sol)} * \text{Fraction absorbée}_{(sol)}}{\text{Fraction bioaccessible } \textit{in vivo}_{(ref)} * \text{Fraction absorbée}_{(ref)}}}$$

Équation 6 : Equation détaillée de la pente de corrélation entre bioaccessibilité relative et biodisponibilité relative

Dans le cadre de l'étude, le paramètre caractéristique du modèle qui permettra de juger la relation entre les deux notions est la valeur de sa pente. Fixer un critère sur ce paramètre est difficile étant donné qu'il n'y a pas de consensus établi dans la littérature. Pour certains auteurs, une corrélation 1:1 doit être obtenue (Oomen *et al.*, 2006) alors que d'autres auteurs affirment que la valeur de la pente de corrélation n'a pas d'importance du moment que les données *in vitro* sont significativement corrélées aux données *in vivo* (Ruby *et al.*, 1999 ; ISAE, 2006). Dans le cadre de l'étude, pour essayer de comprendre et d'établir un critère sur ce paramètre, l'équation de la pente de régression entre biodisponibilité relative et bioaccessibilité relative est détaillée par l'équation 6.

En se basant sur l'hypothèse initiale des tests de bioaccessibilité et en prenant en considération que les données sont obtenues pour un état à jeun (pas de phénomènes d'interaction ou de compétition pour l'absorption), le rapport des termes liés à l'absorption doit être non significativement différent de 1. En effet, **les tests *in vitro* sont basés sur l'hypothèse** selon laquelle **l'absorption d'un composé dissous à partir d'un sol n'est pas différente de l'absorption du composé lorsqu'il est administré sous une forme relativement soluble** (ISO/DIS 17924-1, 2005 ; Oomen *et al.*, 2006). Dans ce cas, l'équation 6 se simplifie et il reste les deux termes de bioaccessibilité relative comme décrit ci-dessous dans l'équation 7 :

$$\text{Pente corrélation} = \frac{\text{Y (bioaccessibilité relative)}}{\text{X (biodisponibilité relative)}} = \frac{\dfrac{\text{Fraction bioaccessible } \textit{in vitro}_{(\text{sol})}}{\text{Fraction bioaccessible } \textit{in vitro}_{(\text{ref})}}}{\dfrac{\text{Fraction bioaccessible } \textit{in vivo}_{(\text{sol})}}{\text{Fraction bioaccessible } \textit{in vivo}_{(\text{ref})}}}$$

Équation 7 : Equation simplifiée de la pente de corrélation entre bioaccessibilité relative et biodisponibilité relative

Ainsi, dans la mesure où le test *in vitro* permet de mimer de manière pertinente la réalité physiologique, les termes de bioaccessibilité relative (*in vitro* et *in vivo*) devraient être similaires et dans ce cas la pente de la corrélation sera égale à 1. Dans le cas contraire, s'il y a une différence de comportement dans la mise en solution des contaminants de la matrice sol entre les conditions *in vitro* et les conditions i*n vivo* alors les termes de bioaccessibilité seront

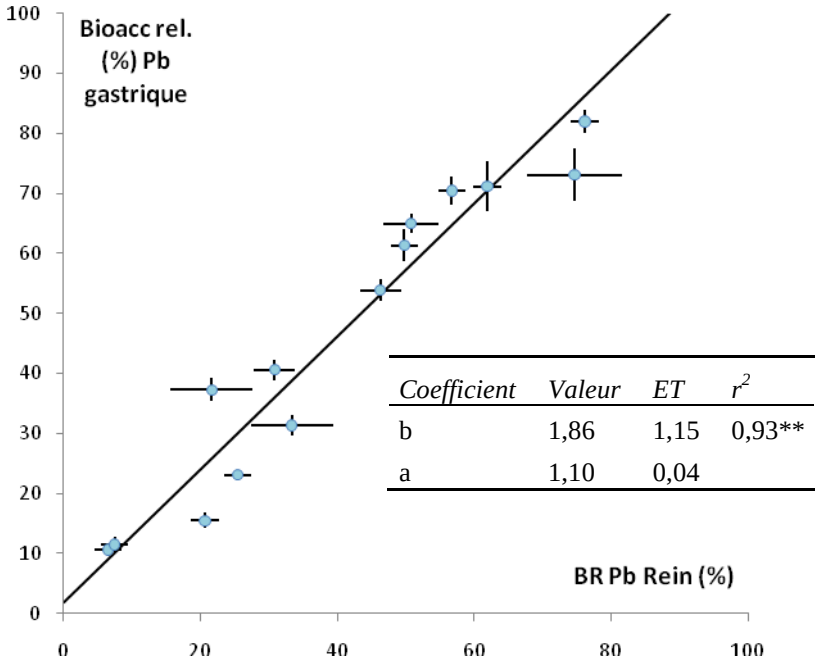
différents. Ainsi, en prenant en considération ces différentes situations, deux cas peuvent se présenter :

- **1er cas : Pente différente de 1**

Une pente de corrélation différente de 1 signifie qu'il y a un écart par rapport à la réalité *in vivo*. La pente pourra être significativement différente de 1 si les absorptions sont différentes ou alors si les termes de bioaccessibilité relative (*in vitro* et *in vivo*) sont différents. Dans ce dernier cas, cela signifie qu'il y a une différence dans les processus de dissolution entre les conditions *in vivo* et *in vitro* et donc que le test UBM ne mime pas correctement la réalité physiologique du tractus gastro-intestinal. Par contre, dans cette configuration, l'hypothèse que la bioaccessibilité soit limitante n'est pas fragilisée si la relation linéaire entre les deux paramètres reste significative.

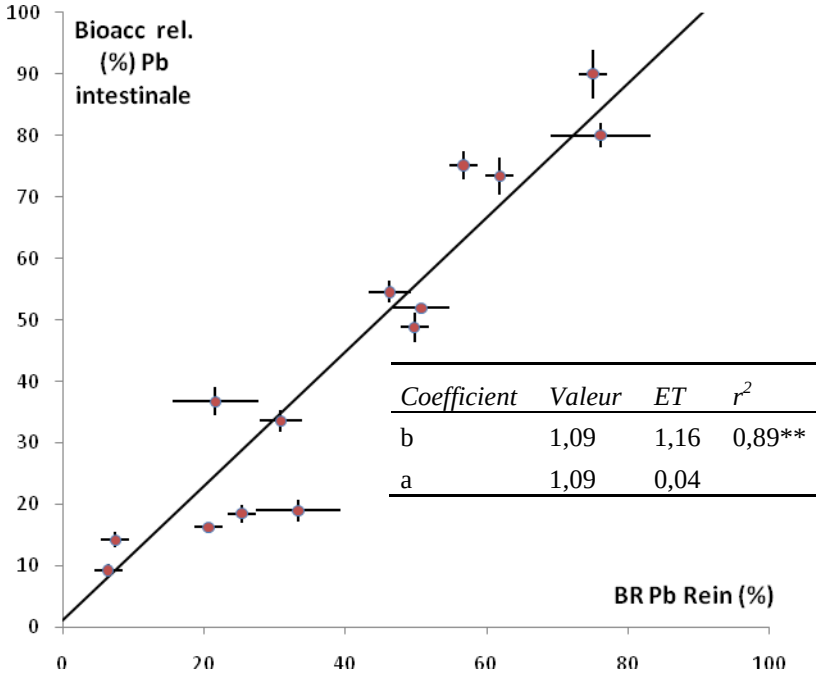
- **2ème cas : Pente égale à 1**

En s'affranchissant des phénomènes de compensation des erreurs d'estimation des différents termes de l'équation, une pente de corrélation non significativement différente de 1 pourra être obtenue si l'hypothèse initiale sur l'absorption est validée et que les termes de bioaccessibilité ne sont pas significativement différents. Dans ce cas, cette situation tend à valider l'hypothèse initiale des travaux, à savoir que pour un ETM donné son absorption est indépendante de la phase porteuse initiale. **Par conséquent, la bioaccessibilité sera une étape limitante dans l'effet de la matrice sol sur la variation de la biodisponibilité si une corrélation linéaire significative est obtenue entre les deux paramètres. Si la pente de la corrélation est proche de 1 alors cela signifie que la méthode mise en œuvre est probablement fidèle aux mécanismes complexes *in vivo*.**



Coefficient	*Valeur*	*ET*	r^2
b	1,86	1,15	0,93**
a	1,10	0,04	

Figure 37 : Corrélation entre la bioaccessibilité gastrique relative (Bioacc rel (%)) déterminée par le test *in vitro* UBM et la biodisponibilité relative (BR (%)) déterminée à partir des données obtenues dans le rein (n=14).
La ligne en trait plein représente la meilleure droite d'ajustement des données et les caractéristiques de cette droite sont regroupées au sein du tableau : pente (a), ordonnée à l'origine (b), écart-type (ET) de la pente et de l'ordonnée à l'origine et le coefficient de détermination r^2, ** indique que r^2 est hautement significatif ($p < 0,01$).



Coefficient	*Valeur*	*ET*	r^2
b	1,09	1,16	0,89**
a	1,09	0,04	

Figure 37 : Corrélation entre la bioaccessibilité intestinale relative (Bioacc rel (%)) déterminée par le test *in vitro* UBM et la biodisponibilité relative (BR (%)) déterminée à partir des données obtenues dans le rein (n=14).
La ligne en trait plein représente la meilleure droite d'ajustement des données et les caractéristiques de cette droite sont regroupées au sein du tableau : pente (a), ordonnée à l'origine (b), écart-type (ET) de la pente et de l'ordonnée à l'origine et le coefficient de détermination r^2, ** indique que r^2 est hautement significatif ($p < 0,01$)

II.) Résultats

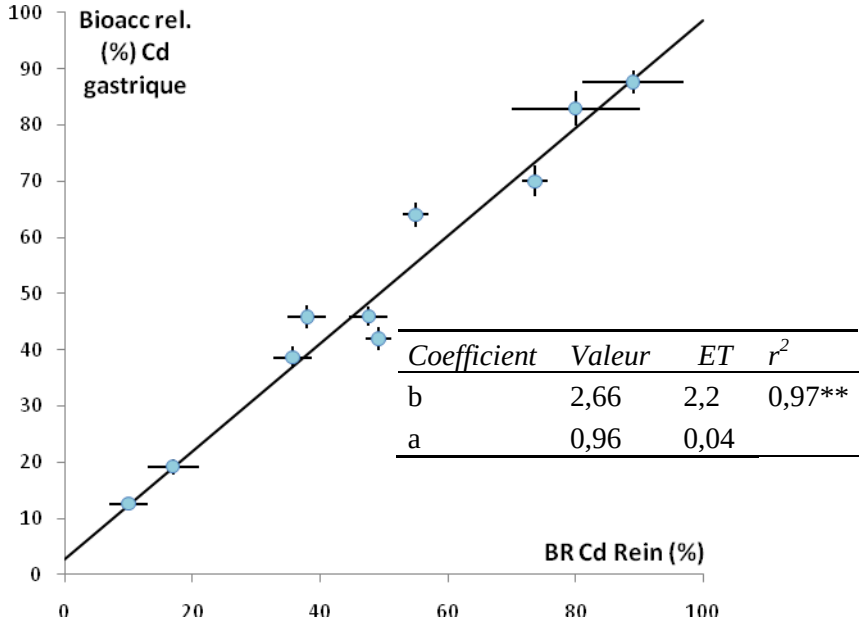
La procédure procreg de SAS confirme que le meilleur modèle d'ajustement de chacune des corrélations entre données *in vivo* et données *in vitro* pour chaque contaminant est un modèle linéaire ($p < 0,01$). Les résultats présentés ci-dessous sont donc les résultats des régressions linéaires obtenues pour les quatre contaminants métalliques par le logiciel FREML.

II.1) Etude des corrélations *in vivo/in vitro* pour le plomb

Les corrélations entre les valeurs de bioaccessibilité relative et de biodisponibilité relative du plomb sont effectuées uniquement pour les données obtenues à partir du rein (Cf. chapitre 3).

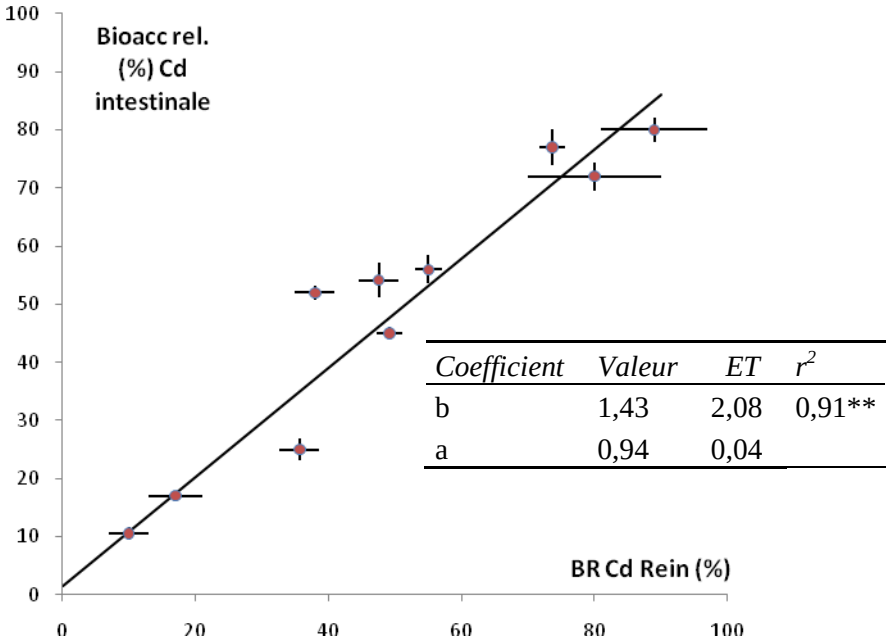
II.1.1) Résultats pour la phase gastrique du test UBM

La corrélation obtenue entre la bioaccessibilité gastrique relative et la biodisponibilité relative pour le plomb est présentée sur la figure 37. Premièrement, les résultats montrent qu'une corrélation hautement significative est obtenue ($r^2 > 0,93$; $p < 0,01$). L'écart-type résiduel de la régression est de 2,7. La corrélation est obtenue sur une gamme de valeurs très large (de 10% à 82%) et avec une très bonne répartition des valeurs sur toute la gamme. La pente de la corrélation n'est pas significativement différente de 1 ($p > 0,05$) et l'ordonnée à l'origine n'est pas significativement différente de 0 ($p > 0,05$). Ainsi, le modèle obtenu répond à chacun des critères établis pour valider la corrélation entre bioaccessibilité relative et biodisponibilité relative.



Coefficient	*Valeur*	*ET*	r^2
b	2,66	2,2	0,97**
a	0,96	0,04	

Figure 38 : Corrélation entre la bioaccessibilité gastrique relative (Bioacc rel (%)) déterminée par le test *in vitro* UBM et la biodisponibilité relative (BR (%)) déterminée à partir des données du rein (n=10).
La ligne en trait plein représente la meilleure droite d'ajustement des données et les caractéristiques de cette droite sont regroupées au sein du tableau : pente (a), ordonnée à l'origine (b), écart-type (ET) de la pente et de l'ordonnée à l'origine et le coefficient de détermination r^2, ** indique que r^2 est hautement significatif ($p < 0,01$)



Coefficient	*Valeur*	*ET*	r^2
b	1,43	2,08	0,91**
a	0,94	0,04	

Figure 39 : Corrélation entre la bioaccessibilité gastro-intestinale relative (Bioacc rel (%)) déterminée par le test *in vitro* UBM et la biodisponibilité relative (BR (%)) déterminée à partir des données du rein (n=10).
La ligne en trait plein représente la meilleure droite d'ajustement des données et les caractéristiques de cette droite sont regroupées au sein du tableau : pente (a), ordonnée à l'origine (b), écart-type (ET) de la pente et de l'ordonnée à l'origine et le coefficient de détermination r^2, ** indique que r^2 est hautement significatif ($p < 0,01$)

II.1.2) Résultats pour la phase gastro-intestinale du test UBM

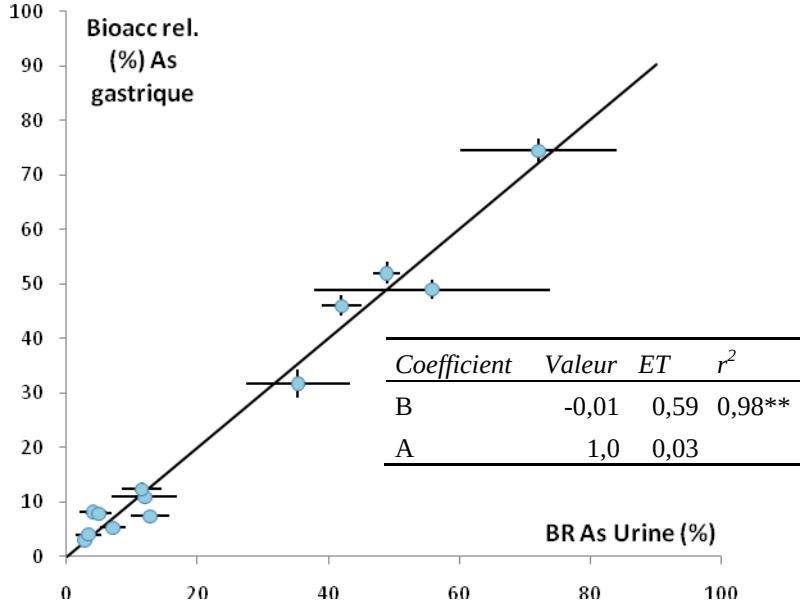
La corrélation obtenue entre la bioaccessibilité intestinale relative et la biodisponibilité relative pour le plomb est présentée sur la figure 38. Une corrélation hautement significative est obtenue (r^2 = 0,89 ; p <0,01). Cependant, la figure 38 montre qu'il y a une dispersion un peu plus importante des données par rapport à la droite d'ajustement comparée à la corrélation obtenue pour la phase gastrique. En effet, l'écart-type résiduel est de 4,8 et donc quasiment deux fois plus important que pour la phase gastrique. Par contre, la pente obtenue est quasiment identique à celle obtenue au sein de la phase gastrique. Elle est égale à 1,09 ± 0,04 et elle n'est pas significativement différente de 1 (p > 0,05). L'ordonnée à l'origine de la droite de corrélation est de 1,09 ± 1,16. Cette valeur n'est pas significativement différente de 0 (p > 0,05). Ainsi, comme pour la phase gastrique, la corrélation obtenue répond à chacun des critères établis pour valider la corrélation entre bioaccessibilité relative et biodisponibilité relative.

II.2) Etude des corrélations *in vivo/in vitro* pour le cadmium

Pour le cadmium, les corrélations sont simplement effectuées avec les données de biodisponibilité relative obtenues pour le rein étant donné que celle-ci a été principalement déterminée au sein de ce compartiment cible (Cf. chapitre 3).

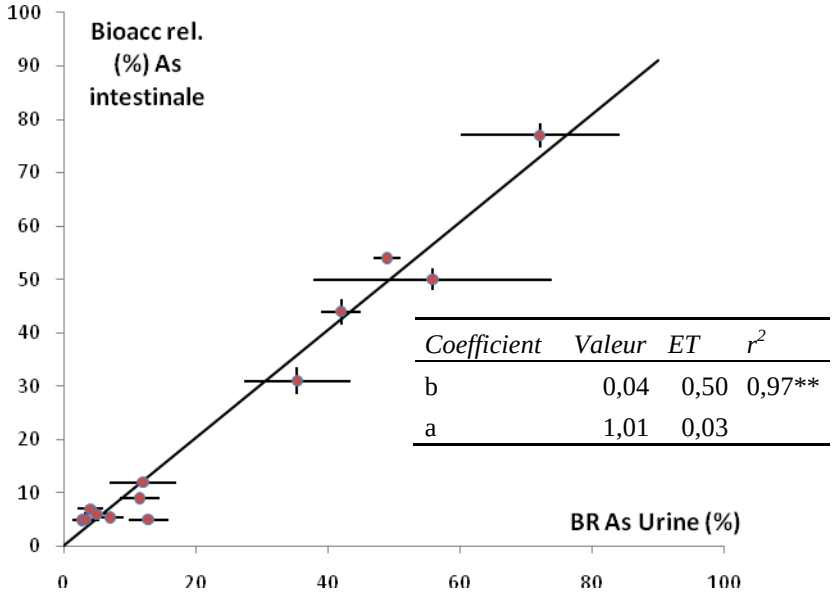
II.2.1) Résultats pour la phase gastrique du test UBM

La figure 39 montre pour le cadmium la corrélation obtenue entre la bioaccessibilité gastrique relative et la biodisponibilité relative déterminée à partir des données obtenues pour le rein. En dépit du fait que la biodisponibilité relative n'a été déterminée que pour 10 sols, la valeur du coefficient de détermination est de l'ordre de 0,97 et l'écart-type résiduel est de 3,4. De plus, la corrélation est obtenue pour une large gamme de valeurs de biodisponibilité relative (13% à 96%) et les valeurs obtenues pour les 10 sols recouvrent la majorité de la gamme de valeur. La pente de corrélation obtenue est de 0,96 ± 0,04, n'est pas significativement



Coefficient	*Valeur*	*ET*	r^2
B	-0,01	0,59	0,98**
A	1,0	0,03	

Figure 40 : Corrélation entre la bioaccessibilité gastro-intestinale relative (Bioacc rel (%)) déterminée par le test *in vitro* UBM et la biodisponibilité relative (BR (%)) déterminée à partir des données obtenues dans l'urine (n=13).
La ligne en trait plein représente la meilleure droite d'ajustement des données et les caractéristiques de cette droite sont regroupées au sein du tableau : pente (a), ordonnée à l'origine (b), écart-type (ET) de la pente et de l'ordonnée à l'origine et le coefficient de détermination r^2, ** indique que r^2 est statistiquement significatif ($p < 0,01$)



Coefficient	*Valeur*	*ET*	r^2
b	0,04	0,50	0,97**
a	1,01	0,03	

Figure 41 : Corrélation entre la bioaccessibilité gastrique relative (Bioacc rel (%)) déterminée par le test *in vitro* UBM et la biodisponibilité relative (BR (%)) déterminée à partir des données obtenues dans l'urine (n=13).
La ligne en trait plein représente la meilleure droite d'ajustement des données et les caractéristiques de cette droite sont regroupées au sein du tableau : pente (a), ordonnée à l'origine (b), écart-type (ET) de la pente et de l'ordonnée à l'origine et le coefficient de détermination r^2, ** indique que r^2 est statistiquement significatif ($p < 0,01$)

différente de 1 et montre que la bioaccessibilité gastrique relative du cadmium et similaire à sa biodisponibilité relative dans les sols. De même, la valeur de l'ordonnée à l'origine est non significativement différente de 0 (2,6% ± 2,2) ($p > 0,05$).

II.2.2) Résultats pour la phase gastro-intestinale du test UBM

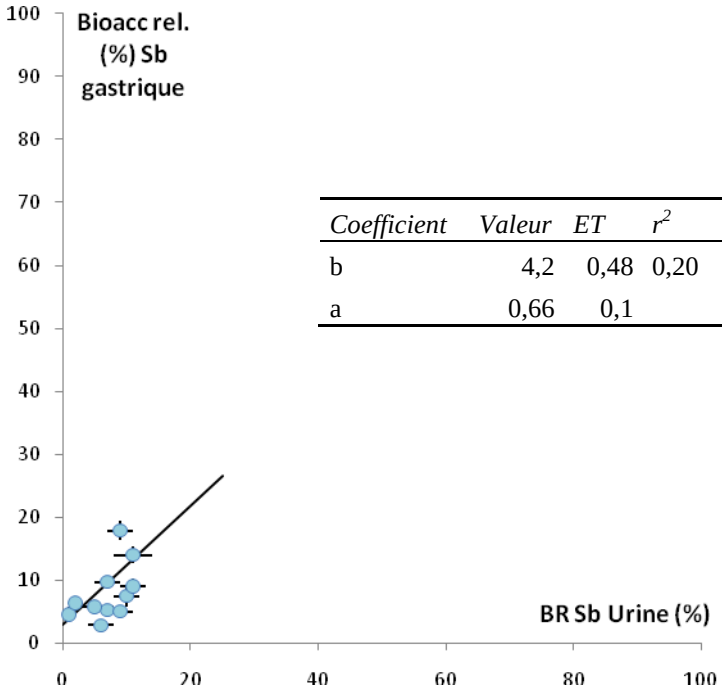
La figure 40 présente la corrélation obtenue pour la phase gastro-intestinale relative du test UBM. Comme pour le plomb, la corrélation obtenue dans la phase gastro-intestinale est moins satisfaisante que celle obtenue pour la phase gastrique ($r^2 = 0,91$; ETR = 9,5). En effet, la figure 40 montre qu'il y une dispersion des points plus importante pour la phase gastro-intestinale. Cependant, le même modèle de corrélation que celui de la phase gastrique est obtenu. La valeur de la pente est de 0,94 ± 0,04 et celle de l'ordonnée à l'origine est de 1,43 ± 2,08. La valeur de la pente de la corrélation n'est pas significativement différente de 1 et celle de l'ordonnée à l'origine n'est pas significativement différente de 0 ($p > 0,05$).

II.3) Etude des corrélations *in vivo/in vitro* pour l'arsenic

Pour l'arsenic, les corrélations sont simplement effectuées avec les données de biodisponibilité relative obtenues pour l'urine étant donné que celle-ci a pu être déterminée principalement (13 sols) au sein de ce compartiment cible (Cf. chapitre 3).

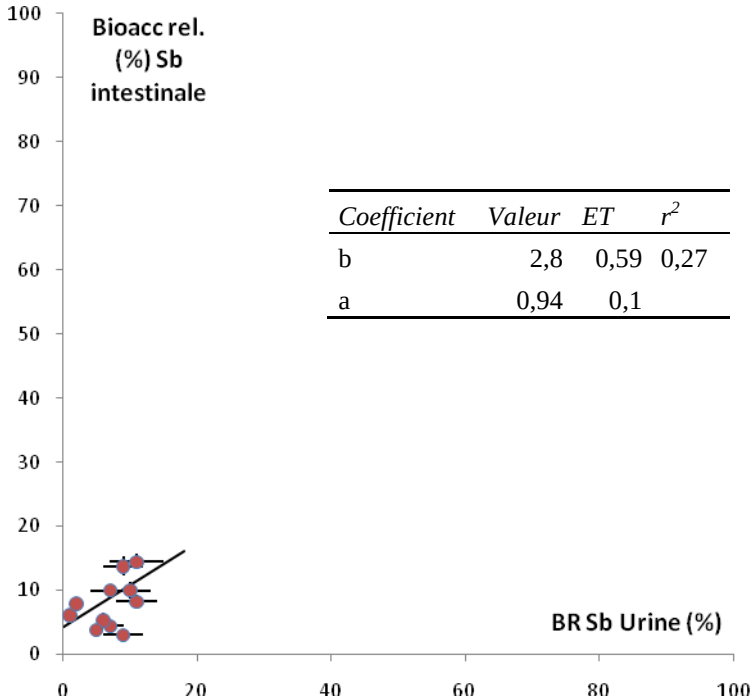
II.3.1) Résultats pour la phase gastrique du test UBM

La figure 41 montre la corrélation obtenue pour l'arsenic entre la bioaccessibilité gastrique relative et la biodisponibilité relative déterminée au sein de l'urine. Une corrélation hautement significative est obtenue entre les données ($r^2 = 0,98$; ETR = 5,2). Du fait que la biodisponibilité relative et la bioaccessibilité relative de l'arsenic sont très faibles pour l'ensemble des sols miniers, il y a de nombreux points en partie basse de la régression. Cependant, la corrélation est obtenue pour des valeurs de biodisponibilité variant de 3% à 72% et ces valeurs sont réparties sur la majorité de la gamme mis à part entre 20% et 35%. Ainsi, pour l'arsenic, la distribution des valeurs est moins satisfaisante par rapport à celle obtenue pour le plomb et le cadmium. La valeur de la pente obtenue pour la meilleure droite d'ajustement est de 1,0 ± 0,03 et donc elle est non significativement différente de 1 ($p > 0,05$).



Coefficient	*Valeur*	*ET*	r^2
b	4,2	0,48	0,20
a	0,66	0,1	

Figure 42 : Corrélation entre la bioaccessibilité gastrique relative (Bioacc rel (%)) déterminée par le test *in vitro* UBM et la biodisponibilité relative (BR (%)) déterminée à partir des données obtenues dans l'urine (n=11).
La ligne en trait plein représente la meilleure droite d'ajustement des données et les caractéristiques de cette droite sont regroupées au sein du tableau : pente (a), ordonnée à l'origine (b), écart-type (ET) de la pente et de l'ordonnée à l'origine et le coefficient de détermination r^2



Coefficient	*Valeur*	*ET*	r^2
b	2,8	0,59	0,27
a	0,94	0,1	

Figure 43 : Corrélation entre la bioaccessibilité gastro-intestinale relative (biocc rel (%)) déterminée par le test *in vitro* UBM et la biodisponibilité relative (BR (%)) déterminée à partir des données obtenues dans l'urine (n=11).
La ligne en trait plein représente la meilleure droite d'ajustement des données et les caractéristiques de cette droite sont regroupées au sein de chaque tableau : pente (a), ordonnée à l'origine (b), écart-type (ET) de la pente et de l'ordonnée à l'origine et le coefficient de détermination r^2

La valeur de l'ordonnée à l'origine (0,01% ± 0,59%) est non significativement différente de 0 ($p > 0,05$). Les critères de validation sont respectés et par conséquent la bioaccessibilité relative déterminée par le test *in vitro* UBM est bien corrélée à la biodisponibilité relative de l'arsenic dans les sols.

II.3.2) Résultats pour la phase gastro-intestinale du test UBM

La corrélation obtenue pour l'arsenic entre la bioaccessibilité gastro-intestinale relative et la biodisponibilité relative déterminée au sein de l'urine est présentée sur la figure 42. La qualité de la régression est identique au sein des deux phases digestives du test *in vitro* UBM. En effet, le coefficient de détermination est de 0,97 et l'écart-type résiduel de la régression est de 6. Ces observations sont cohérentes étant donné qu'au contraire des éléments cationiques, la bioaccessibilité de l'arsenic est identique pour l'ensemble des sols au sein des deux phases digestives du test *in vitro* UBM. Par conséquent, le même modèle de corrélation que pour la phase gastrique est obtenu. La valeur de la pente est de 1,01 ± 0,03 (non significativement différent de 1) et l'ordonnée à l'origine est de 0,04% ± 0,5% (non significativement différente de 0).

II.4) Etude des corrélations pour l'antimoine

Pour l'antimoine, les résultats de biodisponibilité relative pour la majorité des sols n'ont quasiment été obtenus que pour l'urine (Cf chapitre 3). Par conséquent, les données de bioaccessibilité de chacune des phases digestives du test *in vitro* UBM seront uniquement corrélées aux données *in vivo* obtenues par l'urine.

Les figures 43 et 44 présentent les corrélations entre la biodisponibilité relative *in vivo* et la bioaccessibilité *in vitro* déterminée dans chacune des phases digestives du test UBM. En raison des très faibles biodisponibilités et bioaccessibilités de l'antimoine pour l'ensemble des sols, les corrélations linéaires ne sont pas appropriées pour valider le test *in vitro* UBM aux données *in vivo* de biodisponibilité. Cependant, les résultats obtenus par les deux modèles, *in vivo* et *in vitro*, sont cohérents et montrent que l'antimoine est peu bioaccessible et peu biodisponible suite à l'ingestion de sol.

Tableau 37 : Comparaison des critères d'acceptabilité établis au sein de l'étude par rapport aux valeurs obtenues par les principales études de corrélation *in vivo/in vitro*

Test *in vitro*	**Métal/nombre de sols**	**Modèle *in vivo***	**Forme de référence**	**Bioaccessibilité utilisée**	**Gamme de BR* (%)**	**r^2**	**Pente (*in vitro/in vivo*)**	**Ordonnée à l'origine (%)**	**Référence**
PBET	As/15	Porc	Arséniate de sodium	Gastrique (absolue) Intestinale (absolue)	2,7-42,8	0,51 0,75	0,58 0,39	+1,93 +0,07	Rodriguez et Basta, 1999 ; Basta *et al*,. (2007)
IVG	As/15	Porc	Arséniate de sodium	Gastrique (absolue) Intestinale (absolue)	2,7-42,8	0,83 0,82	0,8 0,76	-2,02 -1,36	Rodriguez et Basta, 1999 ; Basta *et al*,. (2007)
IVG	Pb/18	Porc	Acétate de plomb	Gastrique (absolue) Intestinale (absolue)	1-105	0,87 0,64	0,65 0,01	-1,44 +0,52	Schroder *et al.*, 2004
IVG	Cd/10	Porc	Chlorure de cadmium	Gastrique (absolue) Intestinale (absolue)	10-116	0,74 0,30	0,6 0,21	+25,3 +25,8	Schroder *et al.*, 2003
SBRC	As/7	Porc	Arséniate de sodium	Gastrique (absolue)	2-60	0,4	0,44	-5,7	Medlin, 1995
SBRC	As/20	Porc	Arséniate de sodium	Gastrique (absolue)	1-63	0,18	0,36	0,2	USEPA, 2005
SBRC	Pb/15	Porc	Acétate de plomb	Gastrique (absolue)	2-83	0,85	0,87	6,8	Medlin, 1995
SBRC	Pb/19	Porc	Acétate de plomb	Gastrique (absolue)	1-105	0,93	0,88	-0,28	Casteel *et al.*, 2006 ; Drexler *et al.*, 2007
RIVM	Pb/10	Porc	Acétate de plomb	Gastrique (relative) Intestinale (relative)	1-105	0,68 0,66	1,07 1,16	0	Oomen *et al*., 2006
RIVM	As/10	Porc	Arséniate de sodium	Gastrique (relative) Intestinale (relative)	2,7-42,8	0,90 0,79	1,2 1,04	0	Oomen *et al.*, 2006

BR : Biodisponibilité Relative

III.) Discussion

L'objectif de l'étude était de démontrer ici que la bioaccessibilité est bien le facteur limitant dans le processus de biodisponibilité orale. Dans l'étude, par étape limitante, nous attendons le fait que les variations de bioaccessibilité expliquent majoritairement l'effet du sol sur la réduction de la biodisponibilité. Nous avons procédé, pour ce faire, à l'étude des corrélations entre bioaccessibilité relative et biodisponibilité relative. Celles-ci permettent, à absorption considérée équivalente, d'étudier l'impact d'une variation de bioaccessibilité sur le processus de biodisponibilité orale.

III.1) Comparaison des paramètres de validation des tests *in vitro* publiés

Afin de comparer les données obtenues à celles de la littérature, le tableau 37 regroupe les principales études de corrélation entre les différents tests *in vitro* et les données de biodisponibilité relative obtenues par le modèle porcelet. Ces études peuvent être comparées entre-elles et à nos résultats étant donné que les mêmes formes de référence ont été utilisées.
Les données présentées dans le tableau 37 montrent que la première différence par rapport à notre étude est que la majorité des corrélations ont été entreprise entre la bioaccessibilité absolue et la biodisponibilité relative. Pour la phase gastrique, l'utilisation de la bioaccessibilité absolue n'aura pas d'incidence sur la corrélation étant donné que les résultats de bioaccessibilité ont montré qu'il n'y a pas de différence entre les valeurs de bioaccessibilité absolue et relative pour les quatre contaminants étudiés. Ceci peut expliquer l'utilisation de la bioaccessibilité absolue par certaines études utilisant un test *in vitro* présentant seulement la phase gastrique (Drexler *et al.*, 2007 ; USEPA, 2007b). Cependant, l'utilisation des valeurs de bioaccessibilité absolue aura un impact sur la corrélation, notamment pour les éléments cationiques, pour le compartiment intestinal. C'est effectivement le cas pour l'étude de Schroder *et al.* (2004) qui détermine une corrélation pour le plomb au sein la phase gastrique avec une pente de 0,65 alors que pour la phase intestinale la pente de la corrélation est de 0,01. Ces différences s'expliquent par les phénomènes de précipitation et de complexation qui se déroulent entre les deux phases digestives pour les éléments cationiques (Marshner et *al.*, 2006 ; Oomen *et al.*, 2006 ; Juhasz *et al.*, 2009). Les mêmes observations peuvent être réalisées pour le cadmium au sein de l'étude de Schroder *et*

al. (2003). Cette première différence peut rendre difficile la comparaison des données du fait que les paramètres corrélés sont différents.

Ensuite, la majorité de ces études confirme la validation des tests *in vitro* en se basant sur la valeur du coefficient de détermination. Dans le cadre de l'étude, les corrélations obtenues pour le plomb, le cadmium et l'arsenic sont hautement significatives ($r^2 > 0,9$). De même, le tableau 37 montre que la majorité des études possède, au moins pour l'une des phases digestives (gastrique ou intestinale), une valeur de coefficient de détermination significative. Il est important de souligner que le test SBRC présente un coefficient de détermination très faible pour l'arsenic et ce pour deux études distinctes (0,4 et 0,18) (Medlin, 1997 ; USEPA, 2005). Par conséquent, le test SBRC ne semble pas être pertinent pour mesurer la bioaccessibilité de l'arsenic dans les sols. A l'inverse, sur la seule base de ces valeurs de coefficients de détermination de nombreux auteurs concluent en la validation des tests *in vitro*. Cependant, au-delà de la valeur du coefficient de détermination, très peu d'études s'appuient sur d'autres critères pour valider la corrélation. Par exemple, pour l'ensemble des études de l'arsenic, la corrélation est obtenue pour une faible gamme de valeurs (inférieure à 70 points entre la valeur de biodisponibilité la plus faible et la valeur la plus forte). Rodriguez et Basta (1999) et Basta *et al.* (2007) valident le test IVG pour la mesure de la biodisponibilité de l'arsenic mais pour des valeurs variant de 2,7% à 42,8%. Oomen *et al.* (2006) utilisent les données de biodisponibilité obtenues par Rodriguez et Basta (1999) et montrent que le test RIVM permet l'estimation de la biodisponibilité relative de l'arsenic mais pour la même gamme de valeurs.

Finalement, un dernier paramètre majeur qui pourrait être étudié pour conclure sur la validation d'un test *in vitro* est la valeur de la pente de corrélation. Cependant, en ce qui concerne ce paramètre, il est difficile de comparer les études étant donné que pour la majorité d'entre elles la significativité de la pente n'est pas étudiée. En effet, il n'y a pas de consensus sur la valeur que doit prendre la pente de corrélation. Pour certains auteurs, une valeur de pente de corrélation de 1 doit être obtenue (Oomen *et al.*, 2006) alors que d'autres auteurs affirment que la valeur de la pente de corrélation n'a pas d'importance du moment que les données *in vitro* sont significativement corrélées aux données *in vivo* (Ruby *et al.*, 1999 ; ISAE, 2006). Ainsi, le tableau 37 met en évidence qu'en fonction des tests utilisés des pentes de corrélation différentes sont obtenues. Par exemple, l'étude de Rodriguez et Basta (1999)

met en évidence que les tests PBET et IVG sont significativement corrélés pour la phase intestinale mais la pente est divisée par deux dans le cas du modèle PBET (0,76 et 0,39). Les mêmes observations peuvent être faites pour les résultats obtenus pour les études de Schroder *et al.* (2004) et Drexler *et al.*, (2007) qui utilisent les mêmes sols mais des tests *in vitro* différents. En effet, pour la phase gastrique, dans le cadre de l'étude de Schroder *et al.* (2004) une pente de 0,65 est obtenue alors que pour l'étude de Drexler *et al.* (2007), utilisant le test SBRC, la valeur de la pente est de 0,88. Ainsi, les résultats des études de corrélation regroupés au sein du tableau 37 montrent qu'en se basant seulement sur la linéarité et la significativité de la corrélation, deux méthodes peuvent être significativement corrélées aux données de biodisponibilité *in vivo* mais donner des valeurs de bioaccessibilité significativement différentes. Par conséquent, au-delà de la significativité du coefficient de détermination, en relatif, il est important d'étudier et de fixer une valeur pour la pente de corrélation. Ces observations soulignent l'importance de développer une approche multicritère pour conclure en la validation d'un test *in vitro* de bioaccessibilité.

III.2) Une approche multicritère pour valider le test UBM

Dans le cadre de l'étude, pour valider les corrélations obtenues et mettre en évidence que le test UBM permet une estimation pertinente de la biodisponibilité une procédure a été développée et des critères ont été établis.

Ainsi, une première série de paramètres a permis d'estimer la qualité statistique de la corrélation obtenue entre les valeurs de bioaccessibilité relative et de biodisponibilité relative. Pour obtenir une corrélation satisfaisante, il fallait que :

- le coefficient de détermination de la corrélation soit supérieur à 0,6 et significatif ;

- la corrélation devait être obtenue pour une gamme de valeurs importantes avec des valeurs réparties tout le long de la gamme. Ainsi, pour avoir une corrélation robuste, il peut être fixé une variation d'au moins 70 points entre la valeur de biodisponibilité la plus faible et la valeur de biodisponibilité la plus forte.

Ensuite, basée sur la compréhension de la relation entre les deux notions et plus précisément sur la cohérence des paramètres du modèle de corrélation obtenu vis-à-vis du postulat initial des tests *in vitro*, un paramètre sur la pente de corrélation a pu être fixé :

- comme détaillé précédemment pour affirmer que la bioaccessibilité est l'étape limitante de la biodisponibilité une corrélation linéaire significative devait être obtenue. De plus, la valeur de la pente du modèle de prédiction devait être non significativement différente de 1. Dans ce cas, il peut être admis que le postulat des tests *in vitro* est vérifié et que l'absorption d'un contaminant bioaccessible est indépendante de la forme sous laquelle il se présente (forme soluble ou sol). De plus, une valeur de pente proche de 1 permet de valider le fait que le test *in vitro* simule correctement la physiologie du tractus gastro-intestinal. Cependant, si la pente était significativement différente de 1 mais qu'une corrélation linéaire significative était tout de même obtenue alors, la différence de biodisponibilité peut être en partie expliquée par la différence de bioaccessibilité. Dans ce cas, il y a un biais plus ou moins important dans l'estimation de la biodisponibilité en fonction de la valeur de la pente.

En considérant ces différents critères, les données obtenues au cours de cette l'étude indiquent pour les différents éléments traces métalliques :

- *Pour le plomb :*

Les résultats de corrélation obtenus entre la bioaccessibilité relative et la biodisponibilité relative respectent chacun des critères pour les deux phases digestives simulées au sein du test UBM. Par conséquent, les valeurs de bioaccessibilité gastrique et gastro-intestinale obtenues par le test *in vitro* UBM permettent d'estimer la biodisponibilité relative du plomb dans les sols. Cependant, les résultats ont montré une dispersion des valeurs de bioaccessibilité relative plus importante dans le cas de la phase intestinale. Cette variation peut être expliquée, comme nous avons pu le détailler au sein du chapitre 4, par le fait que pour certains sols, les écarts entre bioaccessibilité absolue et intestinale ne sont pas corrigés même en relatif. Ainsi, le modèle intestinal peut être fragilisé pour l'estimation de la bioaccessibilité de certains sols. Cette observation est en accord avec la majorité des études de la littérature qui montre que la

phase gastrique des tests *in vitro* est généralement mieux corrélée aux données de biodisponibilité que la phase intestinale (Ruby *et al.*, 1996 ; Rodriguez et Basta , 1999 ; Schroder *et al.*, 2004).

Pour le plomb, d'autres historiques de contamination auraient pu être utilisés pour estimer la biodisponibilité relative comme, par exemple, des sites contaminés par les traitements de batterie, des sites contaminés par les peintures au plomb ou encore par le trafic routier. Dans ce dernier cas, des formes particulières telles que le tétraéthyle de plomb pourraient être observée. En raison, des caractéristiques spécifiques de ce composé (groupements éthyles) l'absorption par les parois de l'épithélium intestinal pourraient être différente des formes de plomb inorganiques (Venkateswara Rao *et al.*, 2003 ; ATSDR, 2007b). De ce fait, l'absorption du tétraéthyle de plomb pourrait être supérieure à la forme de référence (acétate de plomb) et des valeurs de biodisponibilité relative supérieures à 100% pourraient être obtenues. Par conséquent, les résultats de l'étude ne peuvent s'appliquer qu'à des sols dans lesquels les formes majoritaires de plomb correspondent à celles présentes dans les 16 sols étudiés.

- *Pour le cadmium :*

Pour le cadmium comme pour le plomb, les résultats obtenus montrent que pour chaque phase digestive du test UBM, les corrélations établies peuvent être validées sur la base des critères développés. Les résultats mettent également en évidence une dispersion plus importante des valeurs de bioaccessibilité relative du cadmium pour certains sols. La raison est liée aux réactions de précipitation entre la phase gastrique et intestinale et le fait que les écarts entre les valeurs de bioaccessibilité entre les deux phases ne sont pas corrigés, pour certains sols, même en relatif. Cependant, le test UBM permet une estimation pertinente de la biodisponibilité relative du cadmium dans les sols. Ainsi, les différences de biodisponibilité du cadmium entre un sol et la forme soluble (chlorure de cadmium) peuvent s'expliquer par les différences de bioaccessibilité du cadmium au sein de ces matrices.

- *Pour l'arsenic :*

Pour l'arsenic, les corrélations obtenues sont hautement significatives et respectent les critères de validation. Par conséquent, le test *in vitro* UBM peut être utilisé pour estimer la

biodisponibilité de l'arsenic dans les sols via la détermination de la bioaccessibilité. Les études de corrélation détaillées dans la littérature pour l'arsenic et regroupées dans le Tableau 37 sont majoritairement obtenues sur une faible gamme de valeurs (généralement une variation inférieure à 60%). Cette difficulté à obtenir une large gamme de valeurs pour la biodisponibilité relative peut s'expliquer par le fait que la biodisponibilité de l'arsenic est généralement moins variable que celle du plomb ou du cadmium (Ruby *et al.*, 1999 ; Yang *et al.*, 2002). Pour les sols utilisés dans le cadre de l'étude, une gamme de valeurs de biodisponibilité relative variant de 4% à 72% a pu être obtenue. Cependant, les valeurs ne sont pas correctement réparties. Il serait intéressant de compléter les données par des sols présentant des valeurs de biodisponibilité relative comprises entre 20 et 30% afin d'avoir une corrélation robuste sur toute la gamme. Pour cela, d'autres types de contamination pourraient être utilisés comme, par exemple, des sols agricoles contaminés aux pesticides contenant de l'arsenic ou encore des sols à proximité de structures en bois traités à l'arséniate de cuivre chromaté (ACC) (Pouschat *et al.*, 2006 ; Juhasz et *al.*, 2007b).

- *Pour l'antimoine :*

Finalement, pour l'antimoine, les données obtenues au cours de l'étude sont les premières présentant des valeurs de biodisponibilité et de bioaccessibilité. En raison de la faible variation des valeurs pour l'ensemble des sols, les corrélations linéaires ne répondent pas aux critères établis. Cependant, l'ensemble des données de bioaccessibilité et de biodisponibilité montre que les valeurs sont inférieures à 18% pour les 15 sols étudiés. Dans les 12 autres sols (restant des 27 sols initialement prélevés) la bioaccessibilité a également été estimée et ne dépasse pas 18%. Ainsi, au contraire des trois autres contaminants, les valeurs de bioaccessibilité et de biodisponibilité de l'antimoine sont très peu variables en dépit des différents historiques de contamination et des caractéristiques des sols contrastées. Il sera important de définir la bioaccessibilité de l'antimoine au sein de sols présentant différents historiques de contamination afin de confirmer ou non la faible bioaccessibilité de l'antimoine dans les sols.

Basé sur les critères établis pour valider le test UBM, pour l'ensemble des tests *in vitro* présenté au sein du tableau 37, il semble qu'il n'y a actuellement que deux tests, SBRC et RIVM, qui sont utilisables pour estimer la biodisponibilité des ETM dans les sols (Medlin *et al.*, 1997 ; Oomen *et al.*, 2006 ; Drexler *et al.*, 2007). Cependant, ces tests ne sont validés que pour le plomb. Il est important de rappeler que le test UBM est basé en grande partie sur les caractéristiques du test RIVM (Oomen *et al.*, 2006). Ainsi, la comparaison de ces études montre que pour des sols différents les résultats des corrélations obtenus pour le plomb par ces deux tests (UBM et RIVM) sont cohérents et confirment que la bioaccessibilité permet d'expliquer l'effet du sol sur la variation de la biodisponibilité du plomb.

Le test RIVM pourrait être validé pour l'arsenic en utilisant une gamme de valeurs de biodisponibilité plus large (Oomen *et al.*, 2006). Par contre, les résultats du test SBRC pour l'arsenic montrent qu'au-delà de la faible variation de la gamme de valeur, le coefficient de détermination est faible et la valeur de la pente obtenue est largement inférieure à 1 (0,44 et 0,36). Donc le test SBRC ne permet pas l'estimation pertinente de la biodisponibilité relative de l'arsenic dans les sols (Medlin, 1997 ; USEPA, 2005). Les auteurs expliquent ce résultat par le fait que le test SBRC a été développé initialement pour l'estimation de la bioaccessibilité du plomb et que par conséquent les paramètres du test ne sont pas adaptés à l'estimation de la bioaccessibilité de l'arsenic (USEPA, 2005). Au-delà du fait que le test SBRC ne simule que la phase gastrique, la grande différence par rapport aux tests UBM et RIVM est la simplicité de la solution d'extraction (0,4 M de glycine à pH 1,5) et notamment l'absence de réactifs comme les sels (chlorures et phosphates) et les enzymes (pepsine, mucine). Par conséquent, au contraire du plomb, il semblerait que pour l'arsenic la composition de la solution d'extraction est importante pour l'estimation de la bioaccessibilité. En effet, comme l'étude a pu le montrer, la bioaccessibilité du plomb est vraiment dépendante du pH est donc une solution simplifiée à un pH acide permet d'estimer de manière satisfaisante la bioaccessibilité de ce contaminant alors que pour l'arsenic des conditions supplémentaires (potentiel redox des solutions, présence de sels, force ionique) semblent être nécessaires pour une estimation correcte de sa bioaccessibilité dans les sols. Pour confirmer cette hypothèse, il pourrait être envisagé d'appliquer le test SBRC en utilisant une solution gastrique préparée selon le protocole UBM puis vérifier si la bioaccessibilité obtenue par le test SBRC est correctement corrélée à la biodisponibilité.

Pour résumer, ces résultats montrent que la méthodologie utilisée au cours de l'étude permet de valider le fait que les variations de biodisponibilité du plomb, du cadmium et de l'arsenic dans les différents sols peuvent être estimées par la bioaccessibilité obtenue via le test UBM. De plus, pour ces trois contaminants, une pente de corrélation non significativement différente de 1 est obtenue ce qui conforte le fait que le test *in vitro* UBM permet de simuler de manière pertinente les conditions physiologiques du tractus gastro-intestinal. En s'appuyant sur les données de la littérature présentées au sein du tableau 37, il semble que le test UBM est le seul test de bioaccessibilité actuellement validé pour plusieurs éléments traces métalliques à la fois pour la phase gastrique et la phase intestinale du test de bioaccessibilité. Toutefois, des investigations supplémentaires devraient être menées pour vérifier et affiner les résultats obtenus dans cette étude. Ainsi, plusieurs autres sols issus de sites correspondant à différents types de sources de contamination devraient être considérés.

III.3) Bioaccessibilité gastrique ou intestinale ?

Les données de la littérature montrent généralement que les corrélations obtenues pour la phase gastrique et la phase intestinale d'un même test *in vitro* sont différentes. En effet, les études de Schroder *et al.* (2003, 2004) sur le cadmium et le plomb, montrent que les modèles obtenus pour la phase intestinale sous-estiment largement la biodisponibilité relative comparé à la phase gastrique (Tableau 37). Ces différences dans les corrélations entre les deux phases digestives peuvent s'expliquer par le fait que dans ces études la valeur de bioaccessibilité qui est utilisée est la valeur de bioaccessibilité absolue. En effet, comme nous l'avons montré au sein du chapitre 4, en absolue les valeurs de bioaccessibilité pour les éléments cationiques sont nettement inférieures pour la phase intestinale en raison des réactions de précipitation et de complexation (Ruby *et al.*, 1999 ; Gron *et al.*, 2003). Ainsi, en utilisant, les valeurs de bioaccessibilité relative au sein de l'étude, les mêmes modèles de corrélation sont obtenus pour les deux phases digestives pour l'ensemble des contaminants étudiés. Ces données sont confirmées par l'étude du RIVM qui utilise également la bioaccessibilité relative (Oomen *et al.*, 2006).

En utilisant la bioaccessibilité relative, les phases gastrique et gastro-intestinale du test UBM peuvent être utilisées étant donné que les modèles de prédiction sont quasiment identiques. Cependant, pour le plomb ou le cadmium, comme nous l'avons décrit précédemment, même en relatif, l'évaluation de la bioaccessibilité intestinale peut être fragilisée pour certains sols.

Par conséquent, il sera important pour les évaluateurs de risques, dans le but d'affiner les doses d'exposition, de définir comment intégrer, en relatif ou en absolu, la notion de bioaccessibilité. Ensuite, une autre question se pose concernant l'intérêt à compliquer le modèle *in vitro* si la bioaccessibilité relative gastrique est suffisamment pertinente et plus robuste que la phase intestinale pour estimer la biodisponibilité des ETM. L'intérêt d'introduire la notion de bioaccessibilité au sein de l'évaluation de risques est d'obtenir une valeur d'exposition plus pertinente mais toujours conservatoire afin de ne pas sous-estimer le risque. Dans cette optique, la phase gastrique pourrait être utilisée pour l'ensemble des contaminants, en relatif ou en absolu, puisque les valeurs de bioaccessibilité les plus importantes sont obtenues au sein de cette phase digestive.

IV.) Conclusion

L'étude des corrélations entre la bioaccessibilité et la biodisponibilité confirme l'importance de définir des critères pour valider la corrélation. Basés sur ces différents critères, les résultats de l'étude permettent de valider le postulat de base des tests *in vitro* qui est que la bioaccessibilité est l'étape limitante modulant la variation de la biodisponibilité dans ETM dans les sols. De plus, les résultats confortent le fait qu'il y a une équivalence (corrélation 1:1) entre les paramètres du test *in vitro* UBM et les paramètres physiologiques *in vivo*. Le test UBM est actuellement le seul test *in vitro*, à notre connaissance, corrélé et validé par des données *in vivo* pour le plomb, le cadmium et l'arsenic dans les sols. Pour l'antimoine, les valeurs de biodisponibilité comme de bioaccessibilité sont très faibles (<20%) et, de ce fait, le test UBM n'a pas pu être validé d'un point de vue méthodologique.

Conclusion générale et perspectives

L'exposition systémique des éléments métalliques est gouvernée par la notion de biodisponibilité. Cette dernière est fonction des interactions physiques, chimiques et biologiques qui déterminent l'absorption des contaminants du sol dans la circulation sanguine. Dans le contexte actuel, de l'évaluation des risques sanitaires en France, ce paramètre n'est pas pris en considération. En effet, le risque est calculé à partir des concentrations totales et sans prise en compte du mode d'administration pour la voie considérée. Cependant, la connaissance de la concentration totale d'un polluant dans un sol donné ne présente souvent qu'un intérêt limité pour comprendre et prédire qualitativement et quantitativement les transferts et les risques pour les cibles exposées. Ainsi, dans la majorité des cas, il y a une surestimation de l'exposition et potentiellement du risque. Ces dernières années, de nombreuses entités environnementales, nationales et internationales, ont démontré l'importance de la prise en compte de la notion de biodisponibilité pour développer une procédure d'évaluation des risques plus pertinente. Les approches pour quantifier cette fraction biodisponible nécessitent des études *in vivo* et présentent donc à ce jour des limitations importantes (longues, coûteuses, problème éthique) pour une utilisation en routine. Par conséquent, nos travaux ont eu pour objet de démontrer la pertinence d'utiliser le test *in vitro* UBM pour affiner la connaissance de l'exposition. Plus précisément, l'étude avait pour objectif de confirmer que l'étape de solubilisation, c'est-à-dire la bioaccessibilité, est l'étape limitante de l'effet du sol dans le processus de biodisponibilité orale et que les mesures de bioaccessibilité sont corrélées et validées aux mesures de biodisponibilité.

Dans l'optique de l'étude des corrélations entre biodisponibilité et bioaccessibilité, l'intérêt était d'avoir une large gamme de valeurs pour chacun des ETM. La démarche développée pour atteindre cet objectif a été d'échantillonner 27 sols présentant des sources de contamination différentes. La première partie de ce travail a été de mesurer les caractéristiques physico-chimiques de chaque sol (Chapitre 2). Les résultats de cette caractérisation montrent qu'il y a des différences significatives des caractéristiques physico-chimiques des sols et des distributions des ETM sur les différentes phases porteuses des sols. En effet, les résultats des extractions séquentielles, montrent que le plomb, le cadmium et l'arsenic se distribuent différemment sur les différentes phases porteuses en fonction de

l'historique de contamination. Ainsi, les sols contaminés par les dépôts atmosphériques de la fonderie présentent des formes de plomb, de cadmium et d'arsenic plus mobiles et extractibles que les sols échantillonnés sur les sites miniers. Pour l'antimoine, les résultats montrent que ce contaminant est présent pour l'ensemble des sols dans des phases très peu extractibles (oxy-hydroxydes de fer, sulfures, fraction résiduelle) indépendamment de l'historique de contamination. En se basant sur la caractérisation des échantillons, 15 sols et un matériau de référence (SMR 2710) ont été sélectionnés pour déterminer, dans un premier temps, la biodisponibilité relative via le modèle porcelet puis la bioaccessibilité via le test *in vitro* Unified Barge Method.

Ainsi, les résultats obtenus, dans les chapitres 3 et 4, pour les 15 sols sélectionnés montrent que les valeurs de biodisponibilité et de bioaccessibilité sont très variables d'un sol à l'autre sauf pour l'antimoine. Les variations des valeurs de biodisponibilité et de bioaccessibilité pour le plomb, le cadmium et l'arsenic, confirment qu'il est difficile de raisonner et d'extrapoler les résultats d'un contaminant à un autre ou encore d'un site à un autre présentant des sources de contamination identiques. Par conséquent, il est impossible qu'une simple hypothèse par défaut de biodisponibilité (Par exemple, l'USEPA par le modèle IEUBK donne une valeur par défaut de biodisponibilité relative pour le plomb de 60%) puisse évaluer de façon appropriée les risques associés à une exposition à un contaminant donné pour l'ensemble des sites contaminés. Ainsi, la mesure de ces paramètres doit être réalisée spécifiquement à chaque site contaminé et pour un nombre de sol relativement important représentant les différentes caractéristiques du site contaminé. Dans cette optique, le test UBM présente les avantages d'être un outil *in vitro* simple, rapide et peu coûteux permettant l'estimation de la biodisponibilité relative des contaminants métalliques dans les sols. Cependant, comme nous avons pu le détailler au sein du premier chapitre, avant d'en faire une utilisation de routine, il était important de valider ce test.

La dernière partie de l'étude a ainsi montré que la bioaccessibilité est l'étape limitante de la biodisponibilité et que le test de mesure de bioaccessibilité unifié UBM est pertinent d'un point de vue de la réalité physiologique pour évaluer la biodisponibilité d'un polluant dans un sol contaminé. En effet, basés sur les différents critères établis au cours de l'étude, les résultats de corrélation montrent que le test *in vitro* UBM est validé à la fois pour le plomb, le cadmium et l'arsenic. C'est actuellement le seul test de bioaccessibilité validé par des données

in vivo permettant l'estimation de la biodisponibilité de plusieurs contaminants. Pour l'antimoine, en raison des faibles valeurs de biodisponibilité et de bioaccessibilité pour la totalité des sols, le test UBM n'a pas pu être validé par rapport à la méthodologie utilisée et aux critères établis au sein de l'étude. Ainsi, ces résultats démontrent que les différences de biodisponibilité entre un contaminant présent dans la matrice sol et un contaminant présent sous une forme soluble peuvent être estimées par les différences de bioaccessibilité de l'élément au sein de ces matrices.

Finalement, l'étude a également permis de confirmer que les valeurs de bioaccessibilité et donc de biodisponibilité des éléments traces métalliques dans les sols sont dépendantes de nombreux facteurs. Les résultats de biodisponibilité relative et de bioaccessibilité des ETM ont montré que ces paramètres ne varient pas simplement entre les différentes sources de contamination (minier et fonderie) mais varient également pour des sols prélevés sur le même site contaminé. Au-delà de l'historique de contamination, de nombreux autres facteurs, spécifiques à chaque site contaminé, peuvent influencer les valeurs de bioaccessibilité et de biodisponibilité des contaminants métalliques. Différents paramètres physico-chimiques ont été corrélés à la bioaccessibilité des ETM : pH, la teneur en argile, la teneur en carbonates, la teneur en matière organique, la capacité d'échange cationique ou encore la concentration de certains éléments adsorbants comme le fer ou le phosphore. L'étude a montré que la bioaccessibilité et donc la biodisponibilité des ETM dépend plus de la répartition de l'ETM dans les phases porteuses que de la « composition » physico-chimique du sol. En effet, les résultats ont montré que cette distribution sur les phases porteuses est un paramètre plus robuste que les caractéristiques physico-chimiques des sols pour expliquer et potentiellement prédire la variation de la bioaccessibilité des ETM dans les sols. L'adsorption des contaminants métalliques sur des phases insolubles du sol peut être un phénomène irréversible est donc un processus important qui pourra diminuer leur biodisponibilité et leur bioaccessibilité. Ainsi, la faible variation des valeurs obtenues pour l'antimoine au sein des sols étudiés a pu être expliquée par le fait que l'antimoine est majoritairement sorbé pour l'ensemble des sols aux oxy-hydroxydes de fer et aux sulfures qui sont des phases peu bioaccessibles.

En définitive, les investigations menées dans le cadre de cette recherche doctorale ont permis de mieux cerner la notion de biodisponibilité des contaminants métalliques dans les sols ainsi que ses déterminants ; de mieux comprendre comment les différents paramètres physico-chimiques d'une part interagissent avec la fraction bioaccessible des contaminants dans la matrice sol et d'autre part comment cette fraction bioaccessible module la biodisponibilité. Finalement, l'étude indique la possible utilisation du test UBM pour estimer la biodisponibilité des ETM dans les sols.

Les perspectives issues de ces travaux sont nombreuses :

La méthodologie développée pour valider le test UBM a montré ses limites pour des contaminants faiblement biodisponibles comme l'antimoine. L'antimoine, toujours observé au sein des mêmes phases porteuses (oxy-hydroxydes de fer, sulfures, fraction résiduelle), possède un comportement spécifique dans les sols qui rend le contaminant peu bioaccessible et peu biodisponible. La faible gamme de valeurs obtenue a empêché la validation du test UBM. Dans l'optique, de pouvoir certifier ces faibles valeurs et de pouvoir fixer une valeur de bioaccessibilité standard pour cet élément, il serait important de vérifier que pour d'autres historiques de contamination l'antimoine est également sorbé sur ces phases porteuses. Dans le cas où, d'autres formes d'antimoine sont observées, il sera important d'évaluer la solubilité de ces dernières. Finalement, si ces faibles valeurs sont confirmées, se pose la question de l'intérêt de mesurer la biodisponibilité d'un contaminant qui présente un risque limité suite à l'ingestion de sol ?

L'étude a porté sur quatre éléments traces métalliques, cependant il serait intéressant de vérifier la pertinence du test *in vitro* pour d'autres éléments métalliques comme le nickel ou encore le chrome qui sont des éléments d'intérêts pour l'évaluation des risques et pour lesquels des données de bioaccessibilité obtenus par le test UBM ont été développées. De même, la démarche mise en place au cours de l'étude pourrait être transposée aux développements de tests de mesure de la biodisponibilité et de la bioaccessibilité des contaminants organiques (HAP, PCB) suite à l'ingestion de sol.

Pour les sites et sols pollués, une autre voie d'exposition, l'inhalation de particules par envols de poussières, peut se présenter. Dans le cadre de l'inhalation de particules, deux voies

d'absorption sont possibles. Les plus grosses particules inhalées seront expulsées vers le tractus gastro-intestinal et pourront être potentiellement absorbées au travers des parois de l'épithélium intestinal. Dans ce cas, la bioaccessibilité des contaminants pourra être estimée par le test UBM. Cependant, les particules les plus fines ($PM_{2,5}$; PM_{1}) peuvent atteindre les alvéoles pulmonaires et être potentiellement absorbées au travers de la paroi pulmonaire. Dans ce cas, il serait nécessaire de développer un test *in vitro* simulant les conditions de la région pulmonaire afin d'estimer la fraction bioaccessible des particules inhalées. Au-delà de la thématique des sites et sols pollués, ces différents tests pourraient être appliqués à d'autres matrices comme, par exemple, l'inhalation des poussières ou de nanoparticules comprises dans l'air de zones urbaines.

Finalement, dans l'optique d'utiliser la notion de bioaccessibilité, une étape importante pour la suite de l'étude sera la réalisation d'essais inter-laboratoires permettant de définir la reproductibilité et d'estimer l'incertitude sur la mesure de bioaccessibilité obtenue par le test UBM. Actuellement, la difficulté majeure de la validation des données de bioaccessibilité est l'absence de matériaux de référence indiquant des valeurs de bioaccessibilité certifiées pour les éléments traces métalliques. Des projets de réalisation d'essai inter-laboratoires sont en cours avec les différents membres des groupes BARGE et BARC[14]. L'objectif serait d'utiliser une partie des sols de l'étude pour lesquels des valeurs de biodisponibilité (*in vivo*) sont disponibles et d'utiliser également les valeurs de biodisponibilité relative qui ont été obtenues pour le matériau de référence SMR 2710.

La bioaccessibilité pourrait être appliquée en tant que facteur correctif de la concentration totale permettant une estimation moins conservatrice de l'exposition. Même si les évaluateurs de risques disposent maintenant d'un test *in vitro* validé, il semble difficile, à ce stade, de proposer une méthode d'intégration de ces paramètres dans la gestion effective des sites. Dans l'optique d'une application dans la procédure de l'évaluation des risques, il sera important de définir comment mettre à disposition les données aux évaluateurs de risques (absolu ou relatif ; gastrique ou intestinale) et d'identifier le mode d'intégration de telles données au sein de la procédure de l'évaluation des risques. A l'heure actuelle, il n'y a pas de lignes directrices et d'encadrement méthodologique pour l'intégration de ces données. En tout état de cause, des travaux de recherche complémentaires devront être menés en vue d'intégrer au mieux ces notions dans la gestion des sites et sols pollués.

[14] Bioaccessibility Research of Canada

Références bibliographiques

Adamo P., Dudka S., Wilson M.J., Mchardy W.J. Distribution of trace elements in soils from the sudbury smelting area (Ontario, Cananda). *Water, Air and Soil Pollution*, 2002, 137:95-116.

Alexander F.W., Clayton B.E., Delves H.T. Minerals and trace-metal balances in children receiving normal and synthetics diets. *Quart. J. Med.*, 1974, 169, 89-111.

Allen H.E. Terrestrial ecosystem : an overview. In Bioavailability of metals in terrestrials ecosystems: Importance of partitioning for bioavailability to invertebrates, microbes, and plants (H.E., Allen; Ed.). Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, 2002, p 1-5.

Alloway B.J. Soil processes and the behaviour of heavy metals. In: B.J. Alloway (Ed.), *Heavy metals in soils*. New-York NY. : Second edition Blacker academic and professional, 1995, p. 368

Appel C., Ma L. Concentration, pH, and surface charge effects on cadmium and lead sorption in three tropical soils. *Journal Environmental and Quality*, 2002 31: 581-589.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for antimony. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services. http://www.atsdr.cdc.gov, 1992, [27-06-09]

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for arsenic. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services. http://www.atsdr.cdc.gov, 2007a, [27-06-09]

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxiological profile for lead. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services. http://www.atsdr.cdc.gov, 2007b, [27-06-09]

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for cadmium. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services. http://www.atsdr.cdc.gov, 2008, [27-06-09]

Baize, D. Teneurs totales éléments traces métalliques dans les sols : Paris, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) Editions, 1997, 408 p.

Baize D., Tercé M. Les elements traces métalliques dans les sols. Approches fonctionnelles et spatiales. INRA éditions, Paris, 2002, p.570.

Basta N.T., Foster J.N., Dayton E.A., Rodriguez R.R., Casteel S.W. The effect of dosing vehicle on arsenic bioaccessibility in smelter-contaminated soils. *Jounal of environmental Science and Health Part A*, 2007, 42, 1275-1281.

Basta N.T., Gradwohl R. Estimation of Cd, Pb and Zn bioavailability in smelter-contaminated soils by a sequential extraction procedure. *Journal of Soil Contam*ination, 2000, 9: 149-164.

Battelle Exponent. 2000. Guide for incorporating bioavailability adjustments into human health and ecological risk assessments at US Navy and Marince Corps facilities. *In:* National Research Council. 2003. Bioavailability of Contaminants in Soils and Sediments: Processes, Tools, and Applications. National Academy Press, DC.

Blay K. Sorption wässriger antimony-spezies an bodenbildende festphasen und remobilisierung durch natürliche komplexbildner. Phd thesis, 2000, Technische Universität München

Bittel J.R., Miller R.J. Lead, Cadmium, and Calcium selectivitu coefficients on montmorillonite, illite and kaolinite. *Journal of Environmental Quality*, 1974, 3, 250-253.

Bosso S.T., Enzweiler J. Bioaccessible lead in soils slag, and mine wastes from an abandoned mining district in brazil. Environmental Geochemistry and Health, 2007,30(3), 219-229

Bourrelier P.H., Berthelin J. Contamination des sols par les elements en traces: les risqué et leur gestion. Rapport n°42 à l'acedémie des sciences. Paris, France : Lavoissier Tec et Doc, 1998, p.440.

Bowell R.J. Sorption of arsenic by iron oxides and oxyhydeoxides in soils. *Applied geochemistry*, 1994, 9, 279-286.

Bradham D. K., Dayton, A.D., Basta N.T., Schroder J., Payton M. and Lanno R.P. Effect of soil properties on lead bioavailability and toxicity to earthworms. *Environment Toxicology and Chemistry*, 2005, 25: 769-775.

BRGM. Guide méthodologique du plomb appliqué à la gestion des sites et sols pollués. Ed. BRGM, 2004a, Rapport RP-52881-FR, p.138, [28-06-09]

BRGM. Synthése des travaux de R&D en France (1999-2004) sur la thématique Arsenic. Ed. BRGM, 2004b, Rapport RP-53252-FR, p.159, [28-06-09]

BRGM. Protocole d'échantillonnage des sols urbains pollués par le plomb. Ed. BRGM, 2004c, RP-52928-FR, p.27, [28-06-09]

Bronner F., Pansu S., Stan W.D. An analysis of intestinal calcium transport across the rat intestine. *Am. Journal of Physiology*, 1986, 250 : G561-G569.

Caboche J., Jondreville C., Tack K., Denys S., Rychen G, Feidt C. Tissue Distribution of Sb in piglets orally given graded levels of Sb (V). *Toxicology and Environmental Chemistry*, 2009, 91, 267-278

Cahier du club CRIN. Spéciation des métaux dans le sol. Ed. SACER, 1999, p. 296.

Calabrese E.J., Stanek E.J., James R.C., Roberts S.M. Soil ingestion: A concern for acute toxicity in children. *Journal of Environmental and Health*, 1999, 61: 18-23.

Carrizales L., Razo I., Téllez-Hernandez J.I., Torres-Nerio R., Torres A., Batres L.E., Cubillas A.C., Diaz-Barriga F. Exposure to arsenic and lead of children living near a copper-smelter in San Luis Potosi, Mexico: Importance of soil contamination for exposure of children. *Environmental Research*, 2005, 101: 1-10.

Casteel, SW., R.P. Cowart, C.P. Weis, G.M. Henningsen, E. Hoffman, W.J. Brattin, R.E. Guzman, M.F. Starost, J.T. Payne, S.L. Stockham, S.V. Becker, J.W. Drexler, and J.R. Turk. Bioavailability of lead to juvenile swine dosed with soil from the smuggler mountain NPL site of Aspen, colorado. *Fundamental Applied of Toxicology*, 1997, 36, 177-187.

Casteel SW,Weis CP, Henningsen GM, et al. Estimation of Relative Bioavailability of Lead in Soil and Soil Like Materials Using Young Swine. *Environmental Health Perspectives*, 2006, 114, 1162–71 doi:10.1289/ehp.8852 available at http://dx.doi.org/ [Online 4 April 2006].

Cave M.R., Wragg J., Palumbo B., Klinck B.A. Measurement of the bioaccessibility of arsenic in UK soils. R&D Technical report P5-062/TR02, 2003, Bristish Geological Survey.

Cave M.R., Milodowski A.E., Friel E.N. Evaluation of a method for identification of host physic-chemical phases for trace metals and measurement of their solid-phase partitioning in soil samples by nitric acid extraction and chemometric mixture resolution. *Geochemical Exploration Environmetal Analyses*, 2004, 4, 71-86.

Charman WN, Porter CJH, Mithani S, Dressman JB. Physicochemical and physiological mechanisms for the effects of food on drug absorption: the role of lipids and pH. *Journal of Pharmacology Sciences.*, 1997, 86:269-282.

Citeau, L. & Lamy, I. 2003. Nature and reactivity of natural colloids towards trace metals in soils. Proceedings of the 7th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements (ICOBTE), 15-19 June, Uppsala, Sweden.

Clarkson T.W. Molecular and ionic mimicry of toxic metals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1993, 32, 545-571.

Conil P., Clozel B. Méthodes physiques de séparation des constituants d'un sol contaminé : une première étape pour déterminer la spéciation des métaux. In : club Crin Environement et Ministère de l'Environement (Ed.), Spéciation des métaux dans les sols. Paris, France : Ecrin, 1999, p.41-55.

Cornu S., Clozel B. Extractions séquentielles et spéciation des éléments traces métalliques dans les sols naturels. *Analyse critique, Etude et Gestion des sols*, 2000, 7(3), 179-189.

Das N.C., Padhi A.K., Bandyopadhyay M. A design of a vermiculite column adsorbder for the removal of lead from water. *Environmental Pollution*, 1993, 80, 129-132.

Datta R., Sarkar D. Consideration of soil properties in assessment of Human Health Risk from Exposure to Arsenic-Enriched Soils. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 2005, 1(1), 55-59.

Davis A, Ruby MV, Bergstrom PD. Bioavailability of Arsenic and Lead in Soils from the Butte, Montana, Mining District. *Environmental Science and Technology*, 1992, 26, 461-468.

Davids A., Drexler J.W., Ruby M.V. et al. Micromineralogy of mine wastes in relation to lead bioavailability, Butte Montana. *Environmental Science and Technology.*, 1993, 27, 1415-1425.

Davis, A., Ruby, M. V., Goad, P., Eberle, S., & Chryssoulis, S. Mass balance on surface-bound mineralogic, and total lead concentrations as related to industrial aggregate bioaccessibility. *Environmental Science and Technology*, 1997, 31(1), 37–44.

Davis S.S., Illum L., Hinchcliffe M. Gastrointestinal transit of dosage forms in the pig. *J. of Pharm. and Pharmaco.*, 2001, 53: 33-39.

Dean J.R. Bioavailability, Bioaccessibility and mobility of environmental Contaminants. Ed. Wiley, 2007, p.292, ISBN 0470025786.

Denys S., Caboche J., Tack K., Delalain P. Bioaccessibility of lead in high carbonate soils. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 2007, 42, 1331-1339.

Denys S., Tack K., Caboche J., Delalain P. Bioaccessibility, solid phase distribution, and speciation of Sb in soils and in digestive fluids. *Chemosphere*, 2008, 74, 711-716.

De Sesso JM, Jacobson CF. Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food Chemical and Toxicology*, 2001, 39, 209−228.

De Zwart LL, Rompelberg CJM, Sips AJAM, Welink J and Van Engelen JGM. Anatomical and physiological differences between various species used in studies on the pharmacokinetics and toxicology of xenobiotics. A review of literature Report no. 623860010, 1999, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, the Netherlands.

De Zwart L.L., Haenen H.E.M.G., Versantvoort C.H.M., Sips A.J.A.M. Pharmacokinetics of ingested xenobiotics in children: A comparison with adults. RIVM report 623860011/2002, 2001, p.72.

Diamond G.L., Goodrum P.E., Felter S.P., Ruoff W.L. Gastrointestinal absorption of metals. *Drug Chemical Toxicology*, 1997, 20, 345-368.

Dieter M.P., et al. Comparative toxicity and tissue distribution of antimony potassium tartrate in rats and mice dosed by drinking water or intraperitoneal injection. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 1991, 34, 51-82.

Dieter M.P., Matthews H.B., Jeffcoat R.A., Moseman R.F. Comparison of lead bioavailability in F344 rats fed lead acetate, lead oxide, lead sulfide, or lead ore concentrate from Skagway, Alaska. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 1993, 39, 79–93

Doherty MM, Charman WN. The mucosa of the small intestine: how clinically relevant as an organ of drug metabolism? *Clin. Pharmacokinet.,* 2002, 41, 235–253.

Dominy N.J., Davoust E., Minekus M. Adaptatve function of soil consumption: an in vitro study modeling the human stomach and small intestine. The journal of Experimental Biology, 2004, 207, 319-324.

Dressman J.B., Yamada K. Animal models for oral drug absorption. In: Welling P.G. Tse F.L.S., Dighe S.V., Eds. Pharmaceutical bioequivalence, Vol 48. Dekker New york, 1991, p. 727-739.

Drexler J.W., Brattin W.J. An In Vitro Procedure for Estimation of Lead Relative Bioavailability: With Validation. Human and Ecological Risk Assessment, 2007, 13, 383–401.

Duchaufour P. Abrégé de pédologie: Sol, Végétation, Environnement. 5ème Ed. Paris, France : Masson, SA, 1997, p. 291.

Ellickson, K. M., Meeker, R. J., Gallo, M. A., Buckley, B.T., Lioy, P. J. Oral bioavailability of lead and arsenic from a NIST standard reference soil material. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2001, 40, 128–135.

Ellis, C.R. & Schnoes, C.J. Eating disorder: Pica. eMedicine website [online] (last update: 18 February 2006) www.emedicine.com/ped/topic1798.htm, 2005, [25 juin 09].

Environment Agency. Report on the international workshop on the potential use of bioaccessibility testing in risk assessment of land contamination; Seikat, S. Ed.; 2005, Science report SC040054.

EPA. Toxicological review: cadmium and compounds. In support of summary information on Integrated Risk Information System (IRIS). National Center for Environmental Assessment Office of Research and Development. USEPA, 1999, Washington, DC.

Ethlers L.J., Luthy R.G. Contaminant bioavailability in soil and sediment. *Environment Science and Technology*, 2003, 37, 295A-302A.

Evans J.L. Chemistry of metal retention by soil. *Environmental Science and Technology*, 1989, 23, 1046-1056.

Fendorf S., LaForce M.J., Li G. Temporal changes in soil partitioning and bioaccessibility of arsenic, chromium and lead. *Journal of Environmental Quality*, 2004, 33, 2049-2055.

Finney D.J. Statistical methods in biological assays. 3rd ed. London: Charles Griffin & Co, 1978.

Flora S.J., Singh S., Tandon S.K. Thiamine and zinc in prevention or therapy of lead intoxication. *Journal of International Medecine Research*, 1989, 17, 68-75.

Frau F., Ardau C., Fanfani L. Environmental geochemistry and mineralogy of lead at the old mine area of Baccu Locci (south-east Sardina, Italy). Journal of Geochemical Exploration, 2008, doi:10.1016/j.gexplo.2008.01.005

Freeman, G.B., J.D. Jonhson, J.M. Killinger, S.C. Liao, P.I. Feder, A.O. Davis, M.V. Ruby, R.L. Chaney, S.C. Lovre, and P.D. Bergstrom. Relative Bioavailability of lead from Mining waste soil in Rats. *Fundamental Applied Toxicology*, 1992, 19, 388-398.

Freeman, G.B., J.D. Jonhson, J.M. Killinger, S.C. Liao, A.O. Davis, M.V. Ruby, R.L. Chaney, S.C. Lovre, and P.D. Berggstrom. Bioavailability of arsenic in soil impacted by smelter activities following oral administration in rabbits. *Fundamental Applied Toxicology*, 1993, 21, 83-88.

Freeman, G.B., R.A. Schoof, M.V. Ruby, A.O. Davis, J.A. Dill, S.C. Liao, C.A. Lapin, and P.D. Bergstrom. Bioavailability of arsenic in soil and house dust impacted by smelter activities following oral administration in Cynomolgus Monkeys. *Fundamental Applied Toxicology*, 1995 28, 215-222.

Fullmer C.S. Lead-calcium interaction: Involvement of 1,25-Dihydroxyvitamin D. Environmental Research, 1997, 72, 45-55.

Gal J., Hursthouse A., Cuthbert S. Assessment of the chemical availability of arsenic and antimony in soils from abandoned mining and active industrial areas (SW Scotland and NW Italy). *Environment Chemical Letters*, 2006, 3, 149-153.

Gal J., Hursthouse A., Cuthbert S. Bioavailability of arsenic and antimony in soils from an abandoned mining area, Glendinning (SW Scotland). *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 2007, 42, 1263-1274.

Galvez-Cloutier R., Dubé J.S. An evaluation of fresh water sediments contamination : The Lachine canal sediments case, Montreal, Canada. Part II. Heavy metal particulate speciation study. *Water, Air, and Soil Pollution*, 1998, 102 (3/4), 281-302.

Gasser U.G., Walker W.J., Dahlgren R.A., Borch R.S., Burau R.G. Lead release from smelter and mine waste impacted materials under simulated gastric conditions and relation to speciation. *Environmental Science and Technology*, 1996, 30, 761-769.

Girouard E., Zagury G.J. Arsenic bioaccessibility in CCA-contaminated soils: influence of soil propertie, arsenic fractionation, and particle-size fraction. *Science of total environment*, 2009, 407, 2576-2585.

Goldberg S. Competitive adsorption of arsenate and arsenite on oxides and clays minerals. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 2002, 66, 413-421.

Griffin, S.R., R. Rubenstein, S. Irene, C. DeRosa, and H. Choudhury. Bioavailability in Rats of metals Assorbed to soils. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, Hazleton Laboratories, America, Inc. Poster (No. 623) presented at the Society of Toxicology, 29th Annual Meeting, Miami Beach, FL. February 12-16, 1990.

Gron C, Andersen L. Human bioaccessibility of heavy metals and pah from soil. Environmental Project No. 840, 2003. Danish Environmental Protection Agency.

Gron C. Danish EPA Report on test for bioaccessibility of heavy metals and PAH from soil. Environmental Project No.52339/06, 2005. Danish Environmental Protection Agency.

Guzelian P.S., Henry C.J., Olin S.S. Similarities and differences between children and adults : Implication for risk assessment, 1992. Washington, DC : International Sciences Institute Press.

Hamel S.C., Ellickson K.M., Lioy P.J. The estimation of the bioaccessibility of heavy metals in soils using artificial biofluids by two novel methods : mass-balance and soil recapture. *The Science of the Total Environment*, 1998, 244, 273-283.

Heard M.J., Chamberlain A.C. Effect of minerals and food on uptake of lead from the gastrointestinal tract in humans. *Human Toxicology*, 1982, 1, 411-416.

Hettiarachchi, G. M., & Pierzynski, G. M. Soil lead bioavailability and in situ remediation of lead-contaminated soils: A review. *Environmental Progress*, 2004 23, 78–93.

Hidalgo IJ. Assessing the Absorption of New Pharmaceuticals. *Current Topics in Medicin Chemical*, 2001, 385–401.

Hickey M.G., Kittrick J.A. Chemical partitioning of Cd, Ni and Zn in soils and sediments containing high levels of heavy metals. *Journal of Environmental Quality*, 1984, 13, 189-197.

INERIS. Guide pour l'orientation des actions à mettre en œuvre autour d'un site dont les sols sont potentiellement pollués par le plomb. INERIS DRC-57282/DEPS-R030f, 2004, p.21

Intawongse M., Dean J.R. In vitro testing for assessing oral bioaccessibility of trace metals in soil and food samples. *Trends in Analytical Chemical*, 2006, 25(9), 876-886.

ISEA. Use of In Vitro Bioaccessibility/Relative BioavailabilityEstimates for Metals in Regulatory Settings:What Is Needed? 2007, Bioavailability Symposium Durham, North Carolina.

Jonhson C.A., Moench H., Wersin P., Kugler P., Wenger C. Solubility of antimony and other elements in samples taken from shooting ranges. *Journal Environmental and Quality*, 2005, 34, 248-254.

Juhasz A.L., Smith E., Naidu R. Estimation of Human Bioavailability of arsenic in contaminated soil. In: Langley, A., Gilbert, M. and Kennedy B. (Ed.) Proceedings of the Fifth National Workshop on Assessment of Site Contamination. National Environmental Protection Council Service Corporation, 2003, p.183-194.

Juhasz A.L., Smith E., Weber J. et al. In vitro assessment of arsenic bioaccessibility in contaminated in contaminated (anthropogenic and geogenic) soils. *Chemosphere*, 2007a, 69(1), 69-78.

Juhasz, A.L., Smith, E., Weber, J., Rees, M., Rofe, A., Kuchel, T., Sansom, L., Naidu, R. Comparison of in vivo and in vitro methodologies for the assessment of arsenic bioavailability in contaminated soils. *Chemosphere*, 2007b, 69(6), 961–966.

Juhasz A.L., Smith E., Weber J., Naidu R., Rees M., Rofe A., Kuchel T., Sansom L. Effect of soil ageing on in vivo arsenic bioavailability in two dissimilar soils. *Chemosphere*, 2008, 71(11), 2180-2186.

Juhasz A.L., Weber J., Smith E., Naidu R., Marschner B., Rees M., Rofe A., Kuchel T., Sansom L. Evaluation of SBRC-Gastric and SBRC-Intestinal methods for the prediction of in vivo relative lead bioavailability in contaminated soils. *Environmental Science and Technology*, 2009, 43, 4503-4509.

Kabata-Pendias A., Pendias H. Trace elements in soils and plants. Boca Raton: CRC Press, 2001.

Kelley, M.E., Brauning, S.E., Schoof, R.A., Ruby, M.V. Assessing Oral Bioavailability of Metals in Soil. Battelle Press, Columbus, OH., 2002.

Klinck B.A., Palumbo B., Cave M., Wragg J. Arsenic dispersal and bioaccessibility in mini contaminated soils: a case study from an abandoned arsenic mine in Devon, UK. British Geological Survey Research Report RR/04/003, 2005, p.52

Kwon E., Zhang H., Wang Z., Jhangri G.S., Lu X., Fok N., Gabos S., Li X.F., Le X.C. Arsenic on the hands of children after playing in playgrounds. *Environmental Health Perspectives*, 2004, 112, 1375-1381

Lanphear, B.P., Weitzman, M., Winter, N.L., Tanner, M., Yakir, B., Eberly, S., Emond, M., Matte, T.D. Lead contaminated house dust and urban children's blood lead levels. *American Journal of Public Health*, 1996, 86, 1416-1421.

Lanphear B.P., Roghmann K., Pathways of lead exposure in urban children. *Environmental Research*, 1997 74, 67-73.

Laquatra, I. Childhood Lead Poisoning and its Prevention, Heinz Infant Nutrition Institute, 2001, Homepage [online] http://www.hini.org/HINI/lead3.htm [27-06-09].

Lavelle J.M., Poppenga R.H., Thacker B.J., Giesy J.P., Weis C., Othoudt R., et al. Bioavailability of lead in mining waste : an oral intubation study in young swine. *Science Technology Letters*, 1991, 3, 105-111.

Lee J., Rounce J.R., MackayA.D., Grace N.D. Accumulation of cadmium with time in Romney sheep grazing ryegrass-white clover pasture: effect of cadmium from pasture and soil intake. *Australian Journal of Agricultural Research*, 1996, 47, 877-894.

Lee S.W., Lee B.T., Kim J.Y., KIM K.W., Lee J.S. Human risk assessment for heavy metals and As contamination in the abandoned metal mine areas, Korea. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2006, 119, 233-244.

Leeder J.S., Kearns G.L. Pharmacogenetics in pediatrics. *Pediatric Clinical North American*, 1997, 44, 55-77.

Leleyter L., Probst J.L. A new sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace elements in river sediments. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1999, 73(2), 109-128.

Li L.Y., Li R.S. The role of clay minerals and the effect of H+ ions on removal of heavy metals (Pb^{2+}) from contaminated soils. *Can. J. Geotech./Rev. Can. Geotech.*, 2000, 37(2), 296-307.

Littel R.C., Henry P.R., Lewis A.J., Ammerman C.B. Estimation of relative bioavailability of nutrients using SAS procedures. *Journal of animal science*, 1997, 75, 2672-2683.

Ljung K. Metals in urban playground soils: distribution and bioaccessibility. Doctoral thesis Swedish university of agricultural sciences, Uppsala, 2006, p.67

Ljung K., Otabbong E., Selinus O. Natural and anthropogenic metal inputs to soils in urban Uppsala, Sweden. *Environmental Geochemistry and Health*, 2006, 28, 353-364.

Lowney Y.W., Ruby M.V., Peterson L. And Roberts S.M. Progress toward development of in vitro methods for assessing the relative oral bioavailability of arsenic from soil. Poster presented at Society of Toxicology meeting, 2005, USA.

Lu A.X., Zhang S.Z., ShanX.Q. Time effect on the fractionation of heavy metals in soils, *Geoderma*, 2005, 125, 225-234.

Madrid F., Bioasoli M., Ajmone-Marsan F. Availability and bioaccessibility of metals in fine particles of some urban soils. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2008, 55, 21-32.

Mahaffey K.R., Rader J.I., Schaefer J.M., Kramer S.N. Comparative toxicity to rats of lead acetate from food or water. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, 1980, 25, 541-546.

Mahaffey K.R., Gartside P.S., Gluek C.J. Blood lead levels and dietary calcium intake in 1 to 11 year-old-children: The Second National Health and Nutrition Examination Survey, 1976 to 1980. *Pedia.*, 1986a, 78, 257-262.

Mahaffey K.R., Annest J.L. Association of erythrocyte protoporphyrin with blood lead and iron status in the second National Health and Nutition Examination Survey. *Environmental Research*, 1986b, 41, 327-338.

Manceau A., Marcus M.A., Tamura N. Quantitative speciation of heavy metals in soils and sediments by synchrotron X-ray techniques. In applications of synchrotron radiation in low-temperature geochemistry and environmental science. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry, Mineralogical Society of America*, 2002, 49, 341-428.

Manning B.A., Goldberg S. Arsenic(III) and arsenic (V) adsorption on three California soils. *Soil Science*, 1997, 162, 886-895.

Marcus A.H., Schwartz J. Dose-response curves for erythrocyte protoporphyrin vs blood lead: Effects of iron status. *Environmental Research*, 1987, 44, 221-227.

Marschner B., Welge P., Hack A., Wittsiepe J., Wilhelm M. Comparison of soil Pb in vitro bioaccessibility and in vivo bioavailability with Pb pools from a sequential Soil Extraction. *Environmental Science and Technology*, 2006, 40, 2812-2818

Martin-Garin A. Méthodologie d'étude et modélisation du transport des elements traces dans les aquifères. Application à la migration du Cadmium dans un milieu saturé riche en calcite. Thèse de doctorat, Université Grenoble I.

May H., Jaser A.L., Radwan M.A., Zaghloul I. Pharmacokinetics and tissue distribution of antimony (V) after multiple intramuscular administration in the hamters. *Saudi Pharmar. J.*, 2006, 14, 52-58.

Mcbribe M.B. Chemisorption of Cd on calcite surfaces. Soil Sci. Soc. Am. J., 1980, 44(1), 26-33.

McBride M.B. Reactions controlling heavy metals solubility in soils. Advances in Soil Science, 1989, 26, 1-56.

McBride M.B., Sauvé S., Hendershot W. Solubility control of Cu, Zn, Cd and Pb in contaminated soils. Eur. J. Soil Sci., 1997, 48, 337-346.

McGeer J.,Henningsen G., Lanno R, Fisher N., Sappington K., Drexler, J. Issue paper on the bioavailability and bioaccumulation of metals. USEPA, risk assessment forum, 2004, p.128, Washington DC.

Medlin, A. An in vitro method for estimating the relative bioavailability of lead in humans. M.S. thesis. Univ. of Colorado, Boulder, CO, 1997.

Menzie C.A., Efroymson R.A., Ells S.J., Henningsen G.M., Hope B.K. Risk assessment and risk management. In: Contaminated soils: from soil-chemical interactions to ecosystem management (R.P., Lanno, Ed.). Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, 2003, p.11-72

Mercier G, Duchesne J, and Carles-Gibergues A. A new in vitro test to simulate gastric absorption of copper, lead, tin and zinc from polluted soils. *Environmental Technology*, 2000, 23, 121–33

Minaire Y., Lambert R. Physiologie humaine: La digestion. Simep Ed., 1976, p.313

Minekus M., Marteau P., Havenaar R., Huis in't Velt J.H.J. A multicompartimental dynamic computer controlled model simulating the stomach and small intestine. *Atla-Alternativ Lab Anim,* 1995, 23, 197-209.

Morrison A.L., Gulson B.L. Preliminary findings of chemistry and bioaccessibility in base metal smelter slags. *Science of the total Environment*, 2007, 382, 30-42.

Mushak P. Gastro-intestinal absorption of lead in children and adults : Overview of biological and biophysico-chemical aspect. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 1991, 3, 87-104.

Nathanail C.P., McCaffrey C. The use of oral bioaccessibility in assessment of risks to human health from contaminated land. *Land Contamination Reclamation*, 2003, 11, 309–313

National Research Council. Pesticides in the diets of infants and children. Washington DC: National Academy Press, 1993.

National Research Council. Bioavailability of contaminants in soils and sediments: processes, tools and applications. National Academy Press, Washington DC, 240, 2003.

Navarro M.C., Perez-Sirvent C., Martinez-Sanchez M.J. et al. Lead, Cadmium and Arsenic bioavailability in the abandoned mine site of Cabezo Rajao (Murcia, SE Spain). *Chemosphere*, 2006, 63, 484-489.

NEPI. Assessing the bioavailability of metals in soil for use in human health risk assessment. Bioavailability Policy Project Phase II: Metals Task Force Report. National Environmental Policy Institute, 2000, Washington, DC.

Ng S.L, Chan L.S, Lam K.C, Chan W.K. Heavy metal contents and magnetic properties of playground dust in Hong Kong. *Environment Monitoring Assessment*, 2003, 89, 221–232

Oomen, A.G. Determination of oral bioavailability of soil-borne contaminants. PhD, University of Utrecht, 2000.

Oomen A.G., Hack A., Minekus M., Zeijdner E., Cornelis C. et al. Comparative of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants in an in vitro digestion model. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2002, 46, 183-188.

Oomen AG, Rompelberg CJM, Bruil MA, Dobbe CJG, Pereboom DPKH, Sips AJAM. Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2003a, 44, 281–287.

Oomen A.G., Sips A.J.A.M., Tolls J., Van den Hoop M.A.G.T. Lead speciation in artificial human digestive fluid. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2003b, 44, 107-115.

Oomen A.G., Brandon E.F.A., Swartjes F.A., Sips A.J.A.M. How can information on oral bioavailability improve human health risk assessment for lead-contaminated soils? Implementation and Scientific Basis. RIVM report 711701042/2006, 2006.
Palumbo B, Klinck B. The environmental impact of abandoned lead mining in mid-Wales. British Geological Survey Internal Report IR/02/123, 2002.

Palumboe-Roe B., Cave M.R., Klinck B., Wragg J., Taylor H., O'Donnell K.E., Shaw R.A. Bioaccessibility of arsenic in soils developed over Jurassic ironstones in eastern england. *Environmental Geochemistry*, 2005, 27, 120-130.

Palumboe-Roe B., Klinck B. Bioaccessibility of arsenic in mine waste-contaminated soils: a case study from an abandoned arsenic mine in SW England (UK). *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 2007, 42, 1251-1261.

Pautenbach, D.J. The practice of exposure assessment: A state of the art review (Reprinted from Principles and methods of toxicology, ath edition, 2001). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Review*, 2000, 3, 179-291.

Peijnenburg W.J.G.M., Posthuma L., Eijsackers H.J.P., Allen H.E. A conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes. *Ecotoxicological Science Safety*, 1997, 33, 642-649.

Peijnenburg W.J.G.M., Jager T. Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: matrix issues. *Ecotoxicological Environment Safety*, 2003, 56, 63-77.

Peijnenburg W.J.G.M., Zablokskaja M., Vijver M.G. Monitoring metals in terrestrial environments within a bioavailability framework and a focus on soil extraction. *Ecotoxicological Science Safety*, 2007, 67, 163-179.

Poggio L., Vrscaj B., Schulin R., Hepperle E., Marsan F.A. Metals pollution and human bioaccessibility of topsoils in Grugliasco (Italy). *Environmental Pollution*, 2009, 157, 680-689.

Poon R., Chu I., Lecavalier P., Valli V.E., Foster W., Gupta S., Thomas B. Effects of antimony on rats fallowing 90-Days exposure via drinking water. *Food and Chemical Toxicology*, 1998, 36: 21-35.

Poushat P., Zagury G.J. In vitro gastrointestinal Bioavailability of As is soils collected near CCA-treated utility Poles. *Environmental Science and Technology*, 2006, 40(13), 4317-4323.

Pu XZ, Carlson GP, Lee LS. Oral bioavailability of pentachlorophenol from soils of varying characteristics using a rat model. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, Part A, 2003, 66, 2001–2013.

Rabinowitz M.B., Kopple J.D., Wetherill G.W. Effect of food intake and fasting on gastrointestinal lead absorption in humans. *The Am. of Clin. Nutr.*, 1980, 33, 1784-1788.

Reeder R.J., Schoomen M.A.A. Metal speciation and its role in bioacccessibility and bioavailability. *Mineralogical and Geochemistry*, 2006, 64(1), 59-113.

Rieuwerts, J. S. and M. E. Farago. Lead contamination in smelting and mining environments and variations in chemical forms and bioavailability. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 1995, **7**(4), 113-123.

Rieuwerts J.S., Thornton I., Farago M.E., Ashmoret M.R. Factors influencing metal bioavailability in soils: preliminary investigations for the development of a critical loads for metals. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 1998, 10(2), 61-75.

Rieuwerts J.S., Farago M.E., Cikrt M., Bencko V., Differences in lead bioavailability between a smelting and a mining area. *Water, air and soil pollution*, 2000, 122, 203–229.

RIVM report. Bioaccessibility of Contaminants from Ingested Soil in Humans, Method Development and Research on the Bioaccessibility of Lead and Benzo[a]pyrene. Report No. RIVM 711701012. National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands, pp. 11-46, 2001.

Roberts, S.M., W.R. Weimar, J.R.T. Vinson, J.W. Munson, and R.J. Bergron. Measurement of Arsenic Bioavailability in Soil using a Primate Model. *Toxicological Sciences*, 2002, 67, 303-310

Roberts S.M. Incorporating information on bioavailability of soil-borne chemicals into human health risk assessments. *Human and Ecological Risk Assessment*, 2004, 10(4), 631-635.

Roberts S.M., Munson J.W., Lowney Y.W., Ruby M.V. Relative Oral Bioavailability of Arsenic from contaminated soils measured in the Cynomolgus Monkey. *Toxicological Sciences*, 2006, 95(1), 281-288.

Rodriguez R.R., Basta N.T. An in vitro gastrointestinal method to estimate bioavaible arsenic in contaminated soils and solid media. *Environmental Science and Technology*, 1999, 33, 642-649.

Romero F.M., Villalobos M., Aguirre R. Solid-Phase control on lead bioaccessibility in smelter-impacted soils. *Archives of Environmental Contamination Toxicology*, 2007, 55, 566-575.

Roussel H., Waterlot C., Pruvot C., Bacquet M., Martel B., Lepêtre A., Ciesielski H., Philippe S., Mazzuka M., Douay F. Remediation of metal polluted urban soils and evaluation of danger to human health assessed by in vitro oral bioaccessibility tests. Oral presentation In: 18th annual meeting SETAC, 23-28 may 2008, Warsaw, Poland.

Rowan A.M., Moughan P.J., Wilson M.N., Maher K., Tasman-Jones C. Comparison of the ileal and faceal digestibility of the dietary amino acids in adults humans and evaluation of the pig as a model animal for digestion studies in man. *Br. J. Nutr*., 1994, 71, 29-42.

Royal Society of Chemistry. Fitting a linear functional relationship to data with error on both variables. Analytical Methods Committee, 2002, p.3

Ruby M.V., Davis A., Kempton J.H., Drexler J.W., Bergstrom P.D. Lead bioavailability: dissolution kinetics under simulated gastric condition. *Environmental Science and Technology*, 1992, 26, 1242-1248.

Ruby M.V., Davids S.A., Link T.E., Schoof R., Chaney R.L., Freeman G.B., and Bergstrom P. Development of in vitro screeming test to evaluate the in vivo bioaccessibility of ingested mine-waste lead. *Environmental Science and Technology*, 1993, 27, 2870-2877.

Ruby M.V., Davis A., Schof R., Eberle S., Sellstone C.M. Estimation of lead and arsenic bioavailability using a physiollogically based extraction test. *Environmental Science and Technology*, 1996, 30, 422-430.

Ruby, M.V., Schoof, R., Brattin, W., Goldade, M., Post, G., Harnois, M., Mosby, D.E., Casteel, S.W., Berti, W., Carpentier, M., Edwards, D., Cragin, D. And Chappell, W. Advances in evaluating the oral bioavailability of inorgnics in soil for use in human health risk assessment. *Environmental Science and Technology*, 1999, 33, 3697-3705.

Ryan J.A., Zhang P., Hesterberg D., Chou J., Sayers D.E. Formation of Chloropyromorphite in a lead-contaminated soil amended with hydroxyapatite. *Environmental Science and Technology*, 2001, 35, 3798-3803.

Sadiq M. Arsenic chemistry in soils: an overview of thermodynamic predictions and fields observations. *Water Air Soil Pollution*, 1997, 93, 117-136.

Sarkar D., Makris K.C., Parra-Noonan M.T., et al., Effect of soil properties on arsenic fractionation and bioaccessibility in cattle and sheep dipping vat sites. *Environmental International*, 2007a, 33, 164-169

Sarkar D., Quazi S., Makris K.C. Datta R., Khairon A. Arsenic bioaccessibility in a soil amended with drinking-water treatment residuals. Environmental Pollution, 2007b, 146, 414-419.

Saikat S., Barnes B., Westwood D. A review of laboratory results for bioaccessibility values of arsenic, lead and nickel in contaminated UK soils. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 2007, 42, 1213-1221.

Santillan-Medrano J., Jurinak J.J. The chemistry of lead and cadmium in soil: Solid phase formation. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 1975, 39, 851-856.

Sauvé S., Hendershot W., Alen H.E. Solid-solution partitioning of metals in contaminated soils: Dependence on pH, Total Metal Burben, and Organic Matter. *Environmental Science and Technology*, 2000, 34, 1125-1131.

Scheinost A.C., Rossberg A., Vantelon D., Xifra I. Quantitative antimony speciation in shooting-range soils by EXAFS spectroscopy. *Geochemistry*, 2006, 70, 3299-3312.

Schilderman, P.A.E.L., E.J.C. Moonen, P. Kembers, and J.C.S. Kleinjans. Bioavailability of Soil-Adsorbed Cadmium in Orally Exposed Male Rats. *Environmental Health Perspectives*, 1997, 105, 234-238.

Schroder J.L., Basta N.J., Si J. et al., In vitro Gatrointestinal method to estimate relative bioavailable cadmium in contaminated soil. *Environmental Science and Technology*, 2003, 37, 1365-1370.

Schroder J.L., Basta N.T., Casteel S.W., Evans T.J., Payton M.E., Si J. Validation of in vitro gastrointestinal method to estimate relative bioavailable lead in contaminated soils. *Journal of Environmental Quality*, 2004, 33: 513-521.

Schütz, A., Barregård, L., Sällsten, G., Wilske, J., Manay, N., Pereira, L. & Cousillas, Z.A. 1997. Blood lead in Uruguayan children and possible sources of exposure. Environmental Research 74, 17-23.

Semple KT, Doick KJ, Jones KC, Burauel P, Craven A, Harms H. Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environmental Science and Technology*, 2004, 38(12), 228A–231A.

Sips A.J.A.M., Bruil M.A., Dobbe C.J.G. Bioaccessibility of contaminants from ingested soil in humans. Method development and research in the bioaccessibility of lead and benzo[a]pyrene. RIVM report 711701012/2001, 2001, pp 22-40

Smith E., Naidu R., Alston A.M. Chemistry of arsenic in soils: I. Sorption of arsenate and arsenite by four Australian soils. *Journal of Environmental Quality*, 1998, 3, 113-119.

Smith E., Juhasz A., Naidu R. Human availability of arsenic at mining waste areas in central Victoria. Report of Victoria EPA, 2002.

Smith E., Naidu R., Weber J., Juhasz A.L. The impact of sequestration on the bioaccessibility of arsenic in long-term contaminated soils. *Chemosphere*, 2008, 71, 773-780.

Sposito G. The chemistry of soils. Oxford University Press, 1989.

Stanek EJ, Calabrese EJ, Barnes R, Pekow P. Soil ingestion in adults - results of a second pilot study. *Ecotoxicology Environment Safety*, 1997, 36, 249−257.

Stewart M.A., Jardine P.M., Barnett M.O., Mehlhorn T.L., Hyder L.K. and McKay L.D. Influence of soil geochemical and physical properties on the sorption and bioaccessibility of chromium (III). *Journal of Environment and Quality*, 2003, 32, 129-137.

Takaoka M., Fukutani S., Yamamoto T., Horiuchi M., Satta N., Takeda N., Oshita K., Yoneda M., Morisawa S., Tanaka T. Determination of chemical form of antimony in contaminated soil around a smelter using X-ray absorption fine structure. Anal. Sci., 2005, 21(7), 769-773.

Tang, X.Y., Zhu, Y.G., Shan, X.Q., McLaren, R., Duan, J. The ageing effect on bioaccessibility and fractionation of arsenic in soils from China. *Chemosphere*, 2007, 66, 1183–1190.

Tessier A, Campbell PGC, Bisson M. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Analytical Chemical*, 1979, 51(7), 844-850.

USEPA. Exposure factors handbook. EPA/600/P-95/002Fc. Office of Research and Development, U.S. EPA, Washington, DC. http://www.epa.gov/ncea/exposfac.htm, 1997.

USEPA. Comparison of relative bioavailability of arsenic in soil estimated using data derived with two alternative analytical methods. USEPA, region 8, 2003, p.36

USEPA. Estimation of relative bioavailability of lead in soil and soil-like materials using in vivo and in vitro methods. OSWER 9285.7-77, 2004, Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington, DC.

USEPA. Estimation of relative bioavailability of arsenic in soil and soil-like materials by in vivo and in vitro methods. USEPA, region 8, 2005, p.61

USEPA. Guidance for evaluating the oral bioavailability of metals in soils for use in human health risk assessment. OSWER 9285.7-80, 2007a, Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington, DC, USA

USEPA. Estimation of Relative Bioavailability of Lead in Soil and Soil-Like Materials Using In Vivo and In Vitro Methods. OSWER9285.7-77, 2007b, Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington, DC, USA

Van de Wiele. Oral exposure to environmental contaminants processes of bioavailability and interaction with intestinal microorganisms. PhD University of Gent, 2005.

Van de Wiele T.R., Oomen A.G., Wragg J., Cave M. et al. Comparison of five in vitro digestion models to in vivo experimental results: lead bioaccessibility in the human gastrointestinal tract. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 2007, 42(9), 1203-1211.

Vansertvoort C.H.M., Sips A.JA.M., Rompelberg C.J.M. Methodologies to study human intestinal absorption. RIVM report 630030001, 2000.

Venkateswara Rao J., Kavitha P., Padmanabha Rao A. Comparative toxicity of tetra ethyl lead and lead oxide to earthworms, *Eisenia fetida* (Savigny). *Environmental Research*, 2003, 92, 271-276.

Venugopal B., Luckey T.D. Toxicology of non-radioactive heavy metals and their salts. In: Coulston F., Korte F. (Eds)- Heavy metal toxicity safety and hormonology, vol. 1, Stuttgart, 1974, p.4-74.

Waitz J.A. et al. Physiological disposition of antimony after administration of 124Sb-labeled tartar emetic to rats, mice and monkeys, and effects of tris(p-aminophenyl)carbonium pamoate on this distribution. *WHO bulletin*, 1965, 33, 537-546.

Wang, C.M., Ouyang, H., Wang, J.D., Liu, J.S., Zhang, X.L., Wang, Y. Impact of lead pollution in environment on children's health in Shenyang City. *Environmental Science*, 2003, 24 (5), 17-22

Weis C.P., LaVelle J.M. Characteristics to consider when choosing an animal model for the study of lead bioavailability. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 1991, 3, 113-1191.

Welter E., Calmano W., Mangold S., Tröger L. Chemical speciation of heavy metals in soils by use of XAFS spectroscopy and electron microscopital techniques. *J. Anal. Chem.*, 1999, 364, 238-244.

WHO - World Health Organization. Inorganic Lead. Geneva: IPCS – International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria, 1995, p.165.

Wragg J., Cave M.R. In vitro methods for the measurement of the Oral Bioaccessibility of selected metals and mettaloids in soils: A critical Review. R&D Technical Report P5-062/TR/01 British Geological Survey, 2002.

Wragg J. A study of the relationship betwwen Arsenic bioaccessibility and its solid phase distribution in wellinborough soils. Thesis submitted to the university of nottingham, 2005, p. 428.

Wragg J., Cave M., Nathanail P. A study of the relationship between arsenic bioaccessibility and its solid-phase distribution in soils from Wellingborough, UK. Journal *of Environmental Science and Health Part A*, 2007, 42, 1303-1315.

Yamamoto N., Takahashi Y., Yoshinaga J., Tamaka A., Shibata Y. Size distribution of soil particles adhered to children's hands. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2006, 51, 157-163.

Yang, J. K., M. O. Barnett, P. M. Jardine, N. T. Basta and S. W. Casteel. Adsorption, sequestration, and bioaccessibility of As(V) in soils. *Environmental Science and Technology*, 2002, 36(21), 4562-4569.

Yong R.N., Mohamed A.M.O., Warkentin B.P. Principle of contaminant transport in soils. In: *Developments in Geotechnical Engineering*, 1992, 73, Elsevier Science, Amsterdam.

Ziegler E.E., Edwards B.B., Jensen R.L., Mahaffey K.R., Fomon S.J. Absorption and retention of lead by infants. *Pediat Res*, 1978, 12, 29-34.

Normes Citées

AFNOR NFX 31-130. Qualité des sols. Méthodes chimiques. Détermination de la capacité d'échange cationique et cations extractibles. 1999

ISO/DIS 17924-1. Soil quality assessment of human exposure from ingestion of soil and soil material. Part 1: Guidance on the application and selection of physiologically based extraction methods for estimation of the human. 2005.

NF EN 13346. Détermination des éléments traces et de phosphore. Méthodes d'extraction à l'eau régale. 2000

NF EN 13656. Caractérisation des déchets. Digestion assistée par micro-ondes avec un mélange d'acides fluorhydriques, d'acide nitrique et d'acide chlorhydrique pour la détermination ultérieure d'éléments contenus dans les déchets. 2003

NF ISO 10390. Qualité du sol. Détermination du pH. 1994

NF ISO 10693. Détermination de la teneur en carbonate. Méthode volumétrique. 1995

NF ISO 10694. Dosage du carbone organique et du carbone total après combustion sèche. 1995

NF T 90-210. Qualité de l'eau-Protocole d'évaluation initiale des performances d'une méthode dans un laboratoire. 2009

NF X 31-107. Qualité du sol. Détermination de la distribution granulométrique des particules du sol. Méthode à la pipette. 2003

XPT 90-220. Protocole d'estimation de l'incertitude de mesure associée à un résultat d'analyse pour les méthodes d'analyse physico-chimiques. 1999

ANNEXES

ANNEXE 1 :

Résultats de la caractérisation physico-chimique des 27 sols

Table 1 : Nature des sols prélevés et concentration en mg.kg-^{1} des ETM dans les sols (moyenne ± écart-type, n=3)

Site	Sol	Nature des sols	[Pb] mg.kg-^{1}	[As] mg.kg-^{1}	[Cd] mg.kg-^{1}	[Sb] mg.kg-^{1}
Site 1 minier	1	Stériles	40214 ± 2592	1500 ± 23	24 ± 4	54000 ± 3085
	2	Stériles	32598 ± 1302	25000 ± 1485	150 ± 17	60000 ± 2907
Site 2 minier	3	Stériles	6207 ± 106	82 ± 1	76 ± 1	17 ± 1
	4	Stériles	11665 ± 579	105± 1	106 ± 3	19 ± 1
	5	Stériles	11264 ± 251	390 ± 25	35 ± 3	708 ± 30
	6	Stériles	13492 ± 639	461 ± 19	22 ± 3	735 ± 16
	7	Jardin potager	4482 ± 85	43 ± 1	69 ± 3	21 ± 3
	8	Jardin	16267 ± 587	48 ± 3	54 ± 4	18 ± 1
	9	Jardin Potager	5305 ± 460	126 ± 6	144 ± 8	29 ± 5
	10	Jardin	6791 ± 300	247 ± 14	50 ± 1	99 ± 6
	11	Jardin potager	10654 ± 636	134 ± 6	20 ± 1	69 ± 3
	12	Stériles	4297 ± 186	309 ± 2	27 ± 2	196 ± 10
	13	Stériles	45664 ± 2264	328 ± 4	94 ± 1	418 ± 19
	14	Jardin	19291 ± 1715	214± 19	90 ± 4	98 ± 6
	15	Aire de jeux	37532 ± 1809	297 ± 17	178 ± 5	144 ± 17
	16	Aire de jeux	32833 ± 1414	283 ± 7	81 ± 6	119 ± 10
	17	Jardin	1955 ± 125	137 ± 10	62 ± 1	137 ± 4
Site 3 fonderie	A	Sentier pédestre	30155 ± 2607	21 ± 1	22 ± 1	84 ± 4
	B	Jardin potager	1670 ± 52	44 ± 4	30 ± 1	81 ± 4
	C	Jardin	5590 ± 244	61 ± 5	30 ± 3	175± 3
	D	Aire de jeux	3710 ± 149	24 ± 1	24 ± 1	91± 8
	E	Jardin	2043 ± 210	29 ± 1	27 ± 4	26 ± 3
	F	Jardin	1460 ± 18	18 ± 1	30 ± 3	30 ± 1
	G	Jardin	1830 ± 97	20 ± 1	20 ± 1	18 ± 1
	H	Jardin potager	1630 ± 157	190 ± 17	184 ± 2	72 ± 4
	I	Jardin potager	1737 ± 83	208 ± 7	26± 21	182 ± 8
	J	Jardin	1069 ± 109	21 ± 1	15 ± 1	21 ± 2

Table 2 : Caractéristiques physico-chimiques de chaque sol

Site	Sol	Argiles (%)	Matière Organique $g.kg^{-1}$	Calcaire Total $g.kg^{-1}$	CEC $cmol^{+}.kg^{-1}$	pH
Site 1 minier	1	18	56	19	0,89	6,8
	2	15	41	31	1,56	7,2
Site 2 minier	3	23	177	105	24,7	7,05
	4	14,7	13	159	25	7,9
	5	3,3	4,01	98,9	1,05	7,4
	6	6,1	4,04	96,1	1,02	7,8
	7	5,1	3,15	775	0,6	7,9
	8	8,5	61,7	61,5	6,37	6,4
	9	15,1	144	217	13	7,8
	10	11,4	76,5	203	10,8	7,75
	11	20,7	57,6	50,5	15,2	6,5
	12	10	4,26	757	0,76	8,1
	13	4,5	34	9,63	0,78	5,9
	14	7,4	57,5	156	7,96	6,9
	15	9,2	80,3	35	4,35	6,7
	16	2,8	4,22	138	0,66	8,1
	17	14,6	116	442	18,9	7,65
Site 3 fonderie	A	24,6	112,5	5,1	4,2	6,6
	B	24	145	59,2	13,9	7,7
	C	30,1	120,7	33,2	18,6	7,9
	D	23,2	136	32,7	22	7,2
	E	24,9	110,9	1,2	22,7	6,7
	F	25,1	82	2,8	22	6,9
	G	31,2	58,9	21,9	21,7	7,6
	H	28,8	72,5	7,7	22,5	7
	I	28,7	123,9	4,9	1,2	5,9
	J	34,5	89,3	12,3	13,4	7,2

Table 3 : Concentrations en éléments majeurs dans les sols (moyenne, n=3)

Site	Sol	[Fe] $g.kg^{-1}$	[P] $mg.kg^{-1}$	[S] $g.kg^{-1}$	[Si] $g.kg^{-1}$	[Mn] $mg.kg^{-1}$	[Ca] $g.kg^{-1}$
Site 1 minier	1	36,9	12,0	27,1	64,1	2,9	5,3
	2	49,8	23,0	31,9	62,7	5,1	12,1
Site 2 minier	3	48,2	32,0	3,4	78,4	17,2	27,6
	4	30,6	156,0	12,8	75,4	21,1	33,8
	5	26,9	78,0	14,6	36,9	28,8	47,4
	6	30,2	94,0	18,1	39,5	19,3	32,5
	7	35,3	29,0	17,5	19,8	161,2	301,4
	8	56,1	245,0	22,3	52,8	20,5	29,5
	9	30,9	54,0	1,7	10,7	46,9	117,9
	10	35,0	19,0	2,6	40,9	63,3	86,4
	11	46,0	194,0	0,94	63,9	22,2	29,4
	12	31,1	73,0	21,7	31,7	157,4	293,0
	13	47,5	41,0	27,7	20,1	3,9	4,4
	14	28,3	57,0	17,7	47,4	42,9	80,3
	15	63,6	187,0	13,5	18,6	6,4	4,4
	16	37,0	231,0	61,0	22,7	35,7	57,0
	17	25,9	518,0	10,5	33,7	19,1	34,3
Site 3 fonderie	A	35,4	872,0	0,7	25,5	1,1	20,8
	B	11,0	944,0	1,1	21,0	0,2	83,4
	C	24,1	678,0	13,9	14,4	3,2	39,8
	D	15,2	856,0	0,91	9,7	0,25	80,4
	E	8,4	913,0	4,3	6,3	0,25	26,2
	F	10,3	158,0	0,69	2,7	0,2	90,2
	G	12,6	1234,0	4,9	10,2	0,3	19,9
	H	8,4	1290,0	4,3	3,8	0,4	175,0
	I	29,0	789,0	1,4	5,9	0,7	4,6
	J	18,7	1009,0	5,3	1,9	1,0	3,5

Table 1 : Pourcentage de plomb extrait dans chacune des phases de la procédure d'extraction séquentielle pour les 27 sols (moyenne, n=3)

	Sol	Soluble	Echangeable	Acido-soluble	Ox-Mn	Ox-Fe amorph	Ox-Fe crist	Sulfures	OM	Résiduelle	% recouvrement
Site 1 minier	1	0,2	0,7	5,7	3,9	10,2	19,8	27,4	2,3	30,5	100,7
	2	0,6	1,0	7,9	5,4	11,2	22,1	24,2	5,1	21,7	99,0
Site 2 minier	3	0,9	2,2	8,0	2,7	11,9	8,3	15,8	9,2	40,2	99,2
	4	1,7	2,6	7,3	7,4	13,4	6,6	23,8	9,4	29,1	101,4
	5	3,2	3,3	11,2	3,8	7,1	2,7	20,1	6,4	40,7	98,5
	6	0,9	1,9	15,3	6,9	6,0	10,9	10,6	8,3	29,9	90,7
	7	3,1	9,6	57,5	12,5	3,7	4,5	2,1	4,6	2,4	99,3
	8	2,9	1,4	31,3	8,0	7,2	11,9	7,3	6,7	25,9	102,7
	9	1,7	3,8	29,0	8,9	7,7	3,2	11,1	4,6	30,8	100,8
	10	1,2	3,0	24,0	8,4	7,9	7,0	8,2	6,1	22,9	88,6
	11	1,0	3,3	47,8	0,6	8,9	2,9	8,6	6,7	19,7	99,5
	12	6,0	2,8	47,3	4,3	2,7	1,1	14,7	3,5	19,5	102,9
	13	7,3	12,4	29,6	0,9	15,3	8,4	8,7	0,7	17,4	100,8
	14	0,6	6,2	58,8	1,9	5,1	7,5	2,3	6,7	10,9	99,9
	15	3,1	9,6	57,5	12,5	3,7	4,5	2,1	4,6	2,4	100,2
	16	4,0	8,0	60,4	4,4	13,0	1,9	2,4	2,9	2,9	100,1
	17	3,4	10,2	62,3	10,1	2,9	0,7	4,4	5,1	3,9	104,1
Site 3 fonderie	A	10,2	5,9	32,9	1,0	5,1	9,7	2,6	12,3	10,6	90,3
	B	2,6	4,6	28,5	14,0	4,1	5,1	17,4	9,1	14,2	99,6
	C	6,4	12,5	51,7	10,4	5,8	0,6	2,5	1,5	7,7	99,2
	D	1,0	3,7	41,5	2,8	7,2	4,1	6,1	13,0	10,7	90,0
	E	11,7	17,3	35,0	1,8	2,7	2,8	2,9	5,6	10,7	90,4
	F	5,1	13,9	26,9	11,6	8,7	3,0	7,9	8,5	14,5	100,1
	G	5,7	16,5	31,6	9,5	3,7	3,9	3,4	16,5	9,5	100,4
	H	7,6	5,2	47,0	1,6	19,1	3,6	3,8	1,9	9,6	99,5
	I	8,9	18,3	57,7	0,3	3,3	0,4	0,2	0,4	5,4	93,6
	J	1,9	10,6	50,4	0,9	8,5	6,0	4,5	9,4	2,2	94,3

Table 2 : Pourcentage de cadmium extrait dans chacune des phases de la procédure d'extraction séquentielle pour les 27 sols (moyenne, n=3)

	Sol	Soluble	Echangeable	Acido-soluble	Ox-Mn	Ox-Fe amorph	Ox-Fe crist	Sulfures	OM	Résiduelle	% recouvrement
Site 1 minier	1	<LQ	<LQ	5,7	3,5	<LQ	12,7	21,7	5,2	47,5	96,3
	2	<LQ	1,2	5,7	6,1	6,9	11,5	18,5	2,9	46,7	99,5
Site 2 minier	3	1,7	5,6	37,4	5,1	5,1	1,9	11,5	5,4	19,4	93,3
	4	1,1	2,2	48,7	4,0	4,3	4,5	7,7	1,2	16,9	90,5
	5	3,0	1,6	58,2	4,8	5,3	1,2	4,5	2,9	15,6	97,3
	6	2,6	1,8	35,2	5,1	9,4	6,0	1,7	0,5	30,8	93
	7	12,1	18,0	60,4	1,3	3,4	0,9	1,6	2,3	1,7	101,7
	8	2,7	5,5	44,4	4,8	3,2	4,5	16,2	1,5	17,8	100,6
	9	1,6	18,1	47,9	0,3	0,2	0,0	20,0	3,7	8,7	100,6
	10	2,5	1,5	35,4	6,5	5,5	4,6	15,1	2,8	12,6	86,5
	11	<LQ	6,7	52,4	7,4	10,6	3,0	2,1	1,9	13,9	98,0
	12	6,4	15,4	27,5	7,2	1,6	4,1	9,6	5,1	10,4	87,2
	13	1,4	3,8	18,6	2,8	6,3	4,9	19,4	7,2	33,2	97,6
	14	0,4	1,8	11,7	3,3	18,3	3,7	26,4	2,9	29,7	98,1
	15	3,4	6,6	54,7	1,6	3,6	0,4	12,9	1,4	14,9	99,4
	16	0,1	0,9	11,3	1,1	9,2	5,1	35,8	4,7	23,0	91,1
	17	7,9	12,6	57,9	4,2	4,8	2,4	1,8	1,3	4,9	97,8
Site 3 fonderie	A	9,3	12,9	46,8	5,7	3,9	7,1	<LQ	6,6	3,8	96,0
	B	3,8	5,5	59,8	6,4	3,4	0,3	11,9	0,3	7,4	98,7
	C	11,8	5,7	58,7	6,8	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	9,6	92,7
	D	3,5	12,0	35,9	0,5	15,8	6,7	2,9	2,5	15,8	95,5
	E	<LQ	7,9	37,6	6,4	4,9	5,3	8,8	6,1	18,9	95,9
	F	<LQ	14,4	49,8	<LQ	9,3	7,6	13,8	<LQ	7,6	102,4
	G	8,7	17,9	60,8	<LQ	3,7	<LQ	<LQ	<LQ	7,0	98,0
	H	1,9	12,7	46,2	0,2	5,3	2,1	8,2	1,2	18,4	96,3
	I	12,0	17,8	51,7	<LQ	4,1	<LQ	<LQ	6,4	8,7	100,6
	J	12,9	23,5	38,9	<LQ	7,2	5,9	<LQ	<LQ	10,7	99,1

Table 3 : Pourcentage d'arsenic extrait dans chacune des phases de la procédure d'extraction séquentielle pour les 27 sols (moyenne, n=3)

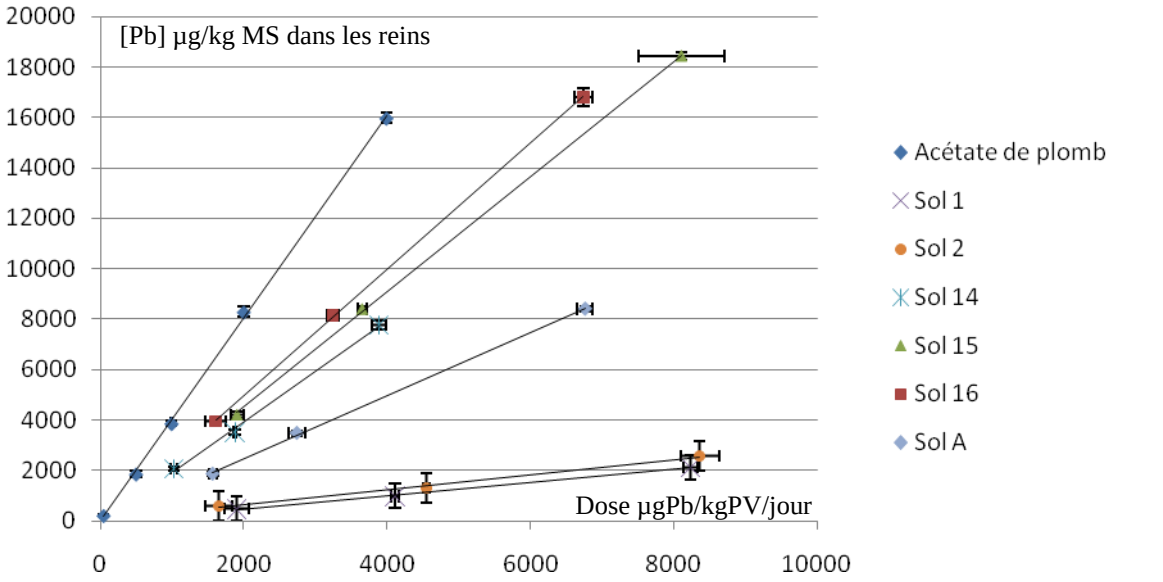
	Sol	Soluble	Echangeable	Acido-soluble	Ox-Mn	Ox-Fe amorph	Ox-Fe crist	Sulfures	OM	Résiduelle	% recouvrement
Site 1 minier	1	0,4	0,7	1,5	2,4	31,1	47,2	1,1	0,9	12,7	98,0
	2	0,09	0,2	1,2	3,9	27,4	46,9	0,9	0,5	13,9	95,0
Site 2 minier	3	0,3	1,9	3,9	2,3	13,6	39,5	1,5	7,4	34,8	105,3
	4	<LQ	<LQ	4,7	1,9	14,4	26,9	3,1	2,2	43,8	97,1
	5	<LQ	0,8	3,3	14,4	8,3	5,0	13,1	4,4	45,0	94,2
	6	<LQ	0,3	6,6	1,8	30,7	9,8	2,2	6,6	40,0	98,0
	7	<LQ	<LQ	0,4	5,3	14,7	6,7	31,1	5,0	22,4	87,6
	8	<LQ	<LQ	2,7	3,3	36,0	17,1	11,0	4,1	22,6	96,7
	9	<LQ	0,1	0,4	0,9	16,8	15,6	38,8	6,8	20,1	99,5
	10	0,2	0,9	3,5	3,4	23,3	24,6	0,2	5,8	36,2	98,1
	11	<LQ	0,2	1,2	3,7	9,9	13,5	45,5	2,2	19,6	95,9
	12	<LQ	<LQ	3,3	0,2	19,5	10,5	14,9	1,3	40,5	90,3
	13	<LQ	0,5	1,4	2,5	33,5	9,2	15,5	1,6	30,3	94,6
	14	<LQ	<LQ	0,7	3,0	25,0	18,0	8,6	4,7	37,5	97,5
	15	0,4	0,2	0,8	5,0	48,5	9,0	8,2	2,2	22,9	97,3
	16	<LQ	<LQ	0,8	2,7	30,4	14,8	8,4	2,6	37,4	97,2
	17	<LQ	0,2	7,2	0,8	28,4	19,3	22,4	0,7	20,9	99,9
Site 3 fonderie	A	9,3	10,1	9,2	3,3	19,7	15,7	17,7	1,7	9,9	96,7
	B	7,3	26,8	9,6	1,7	21,0	2,6	6,4	1,2	19,5	96,2
	C	26,2	13,3	11,0	2,0	21,4	11,1	3,6	0,7	4,5	93,7
	D	3,1	6,3	19,7	1,5	30,1	8,6	4,1	2,0	18,5	94,0
	E	2,2	7,5	22,8	1,7	22,6	17,5	8,6	2,4	9,9	95,1
	F	2,3	5,8	18,0	0,4	20,7	26,1	10,0	0,2	15,5	99,0
	G	6,7	12,7	35,7	1,5	21,6	12,2	1,7	0,2	6,5	98,8
	H	9,2	24,3	22,9	1,0	12,9	4,4	12,7	0,8	12,5	100,7
	I	10,0	16,9	12,7	0,6	26,5	9,4	7,8	2,1	10,3	96,3
	J	2,9	13,0	40,7	2,1	17,8	11,7	8,2	0,3	4,4	101,3

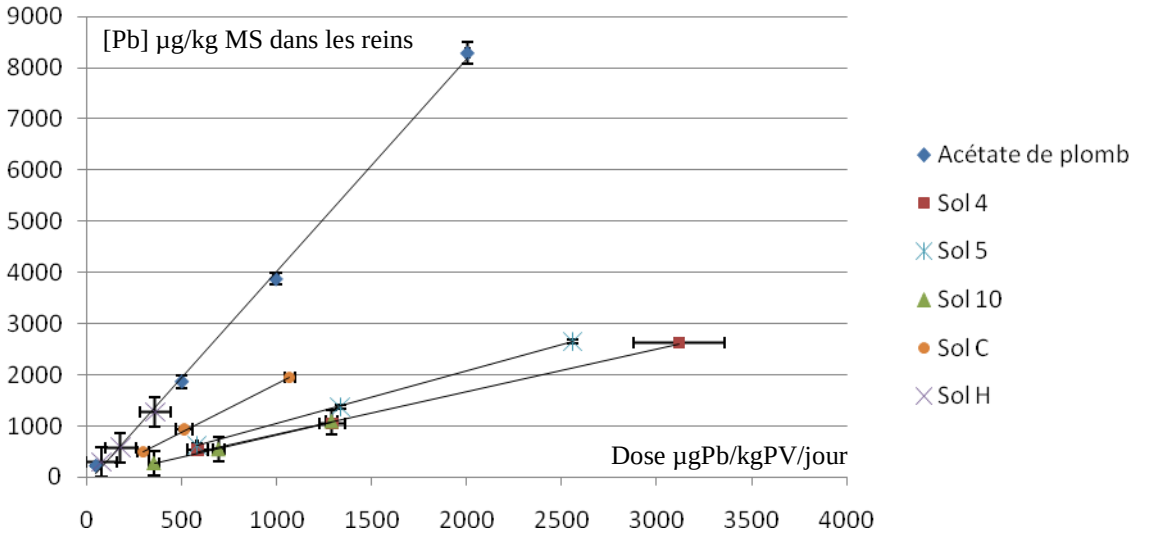
Table 4 : Pourcentage d'antimoine extrait dans chacune des phases de la procédure d'extraction séquentielle pour les 27 sols (moyenne, n=3)

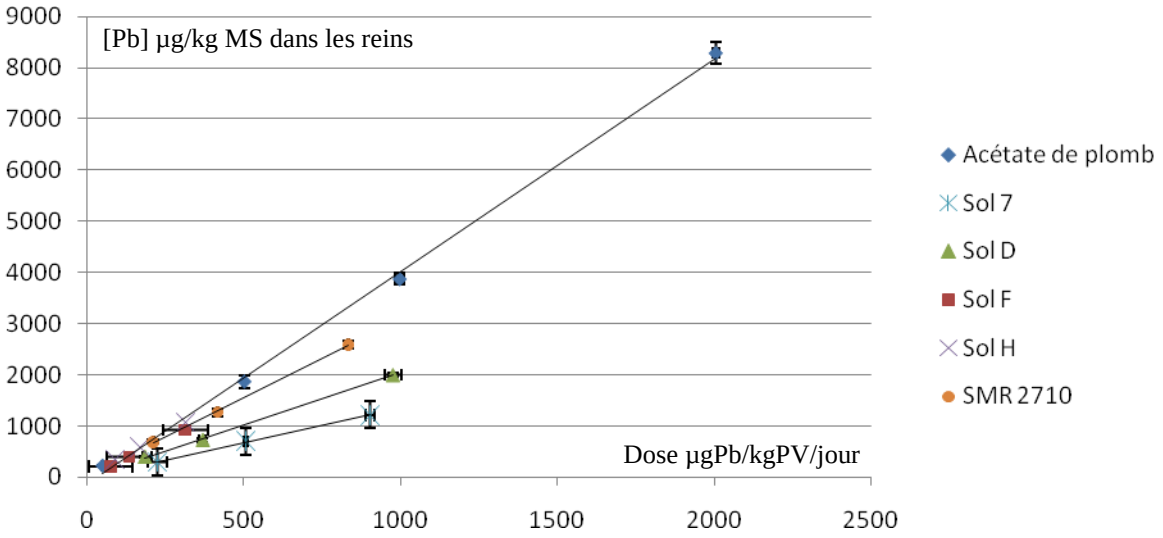
	Sol	Soluble	Echangeable	Acido-soluble	Ox-Mn	Ox-Fe amorph	Ox-Fe crist	Sulfures	OM	Résiduelle	% recouvrement
Site 1 minier	1	0,9	<LQ	2,9	1,1	25,1	51,9	5,4	0,9	8,2	96,6
	2	0,3	<LQ	4,6	0,9	20,2	60,2	1,9	1,1	10,2	99,5
Site 2 minier	3	<LQ	0,8	4,9	1,3	15,5	33,2	3,9	0,5	36,7	95,9
	4	<LQ	1,9	0,5	3,6	15,8	26,2	8,8	3,9	39,0	97,8
	5	<LQ	2,8	0,9	5,9	24,5	29,7	6,8	1,7	29,2	99,5
	6	<LQ	<LQ	2,0	3,2	12,7	29,0	7,7	1,2	41,2	98,8
	7	<LQ	0,4	4,7	13,7	16,9	26,7	8,8	3,5	17,7	94,8
	8	<LQ	0,4	0,2	8,2	12,6	20,2	12,7	2,5	38,7	95,1
	9	<LQ	<LQ	10,3	12,1	18,8	27,5	7,6	1,5	21,0	99,1
	10	<LQ	<LQ	9,3	6,9	17,2	13,5	14,8	0,1	37,4	99,2
	11	0,2	<LQ	0,4	0,9	17,4	33,1	5,7	0,6	32,7	91,5
	12	<LQ	<LQ	0,5	7,3	25,0	13,7	20,2	1,1	27,3	95,0
	13	0,1	0,7	1,4	0,7	15,5	16,7	10,3	1,3	55,0	101,0
	14	<LQ	<LQ	3,1	3,4	16,9	31,1	6,4	4,1	36,1	101,1
	15	0,1	<LQ	1,7	9,1	14,7	30,8	12,1	3,7	28,2	100,3
	16	0,8	0,6	2,4	10,2	15,8	25,7	10,9	4,5	24,8	95,9
	17	<LQ	<LQ	2,3	3,0	34,0	23,6	15,3	1,2	19,9	99,3
Site 3 fonderie	A	0,5	<LQ	1,2	8,4	15,7	36,2	9,0	1,9	27,0	99,9
	B	0,7	1,3	1,8	5,8	18,7	41,7	3,9	2,6	20,1	96,0
	C	0,2	<LQ	4,1	5,5	20,9	32,1	5,0	2,7	22,4	92,9
	D	0,7	<LQ	4,6	8,4	19,8	39,8	8,0	2,3	14,1	99,0
	E	<LQ	<LQ	2,5	12,4	17,1	31,5	8,8	3,3	17,4	92,9
	F	2,5	<LQ	3,3	4,5	15,9	44,7	9,3	3,0	14,6	97,7
	G	<LQ	<LQ	6,9	7,5	26,4	29,7	10,3	3,2	16,1	100,1
	H	2,1	<LQ	2,9	11,1	19,2	33,5	5,6	1,1	20,3	95,7
	I	<LQ	<LQ	5,0	8,8	25,1	24,1	11,1	4,0	20,1	98,2
	J	<LQ	<LQ	5,3	7,9	19,7	47,4	8,2	0,4	7,5	96,3

ANNEXE 3 :

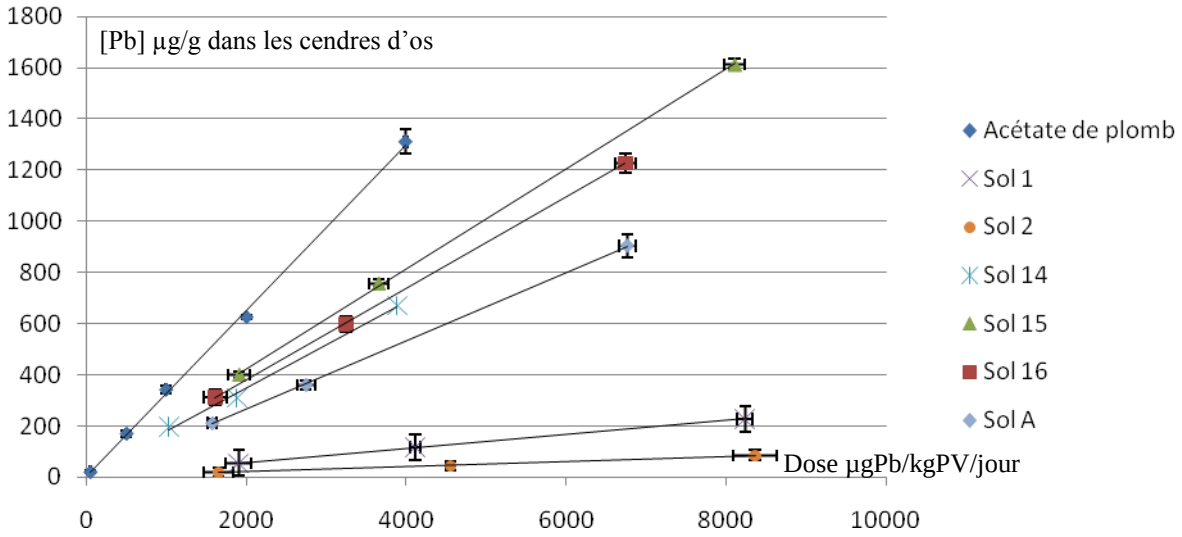
Les courbes dose-réponse des ETM au sein de chaque compartiment cible

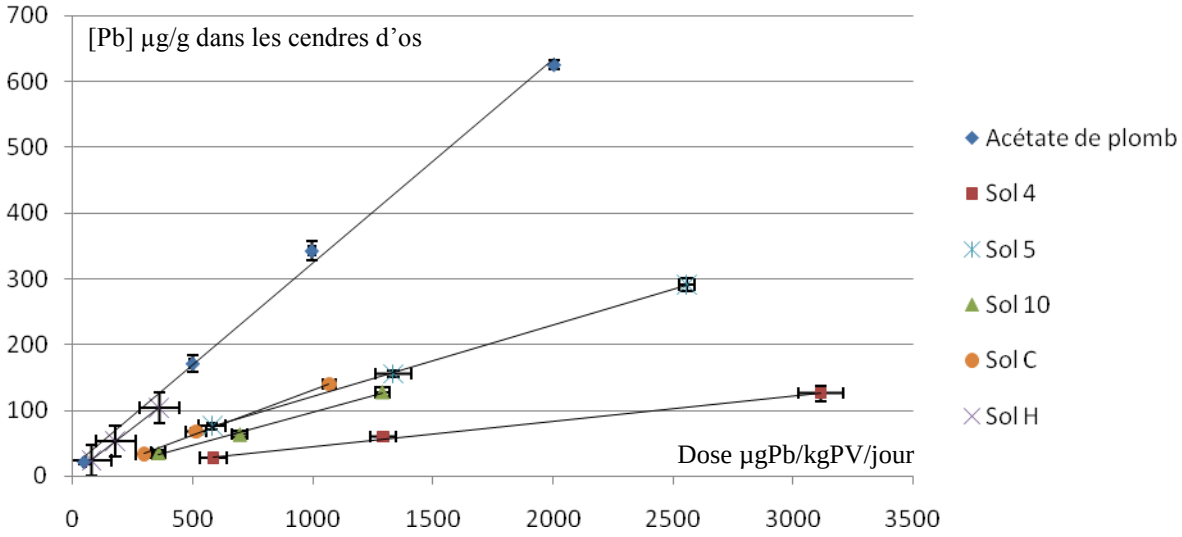


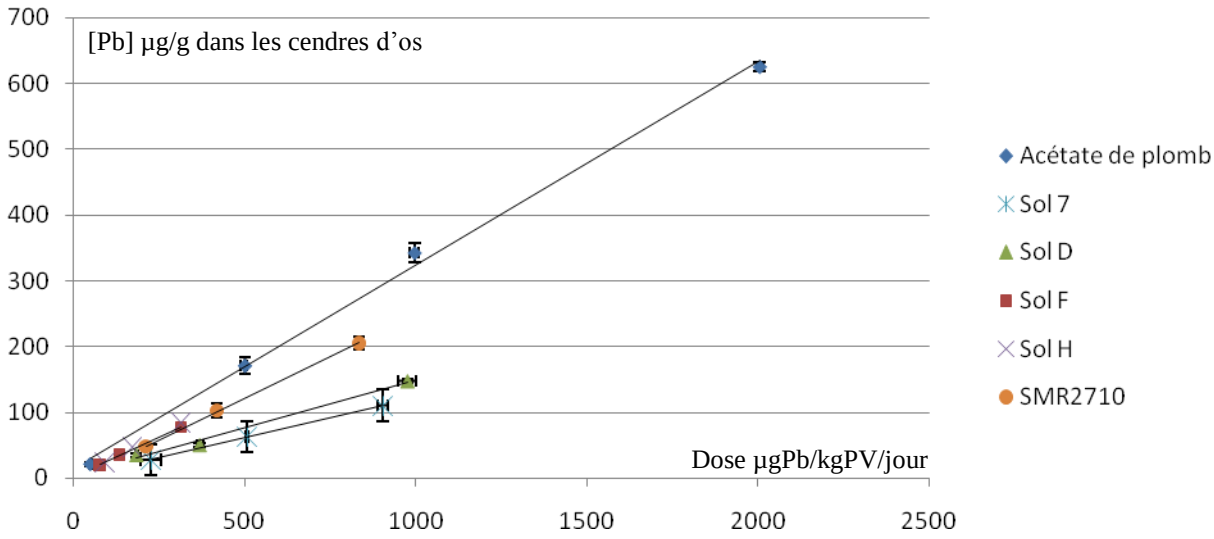




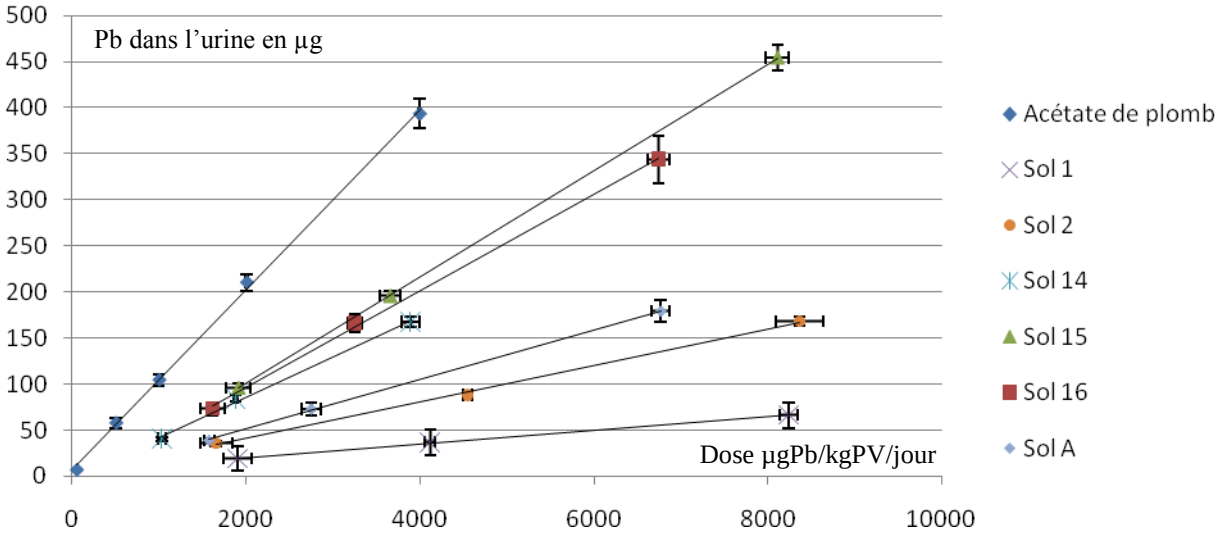
Courbes dose-réponse du plomb dans le rein

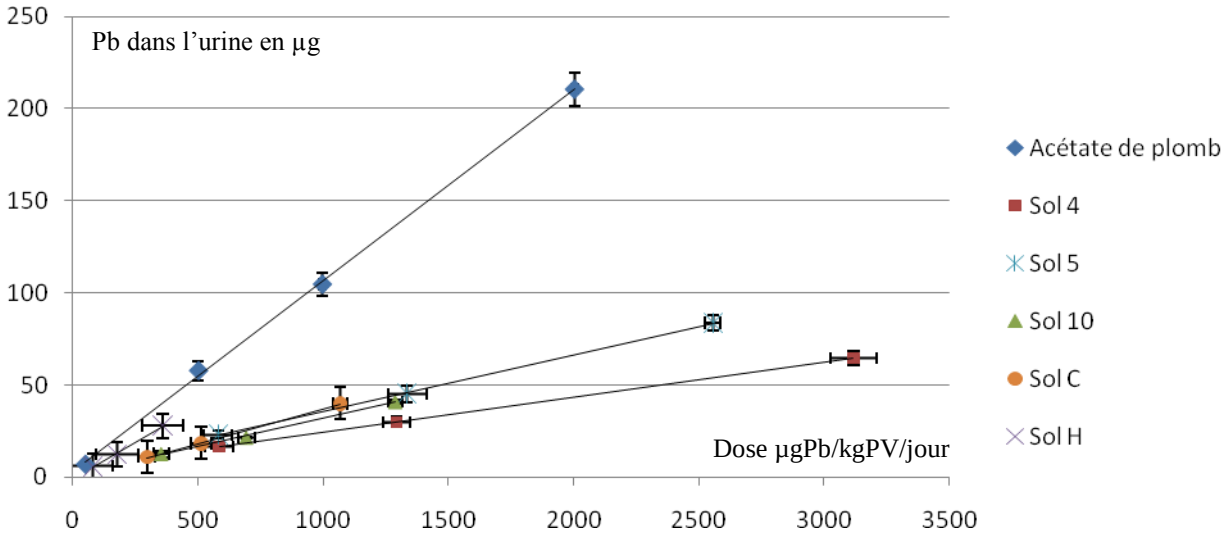


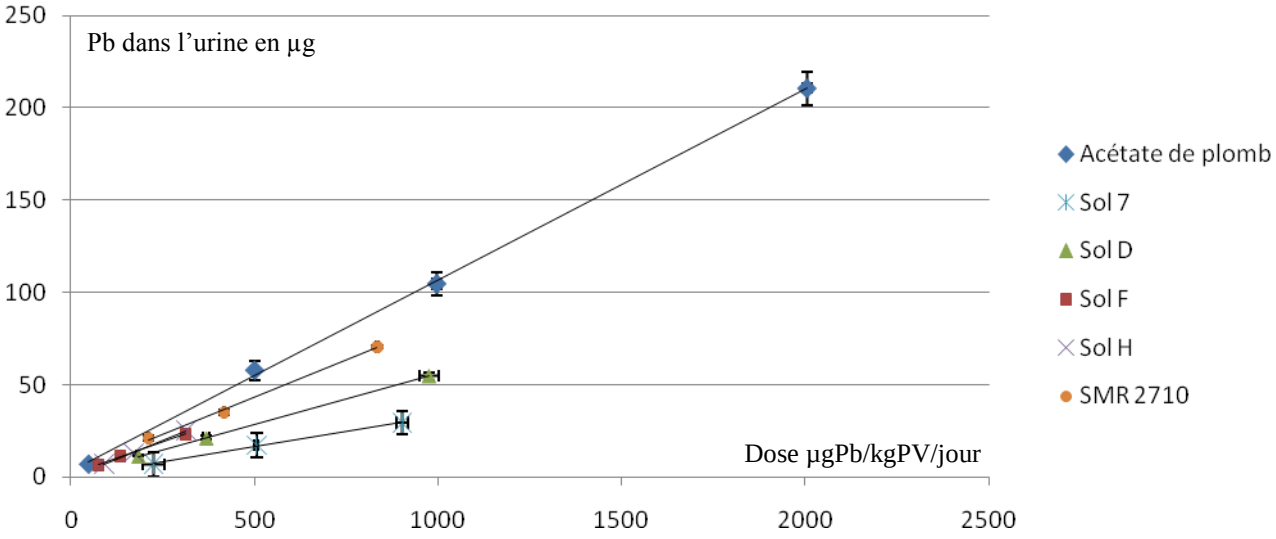




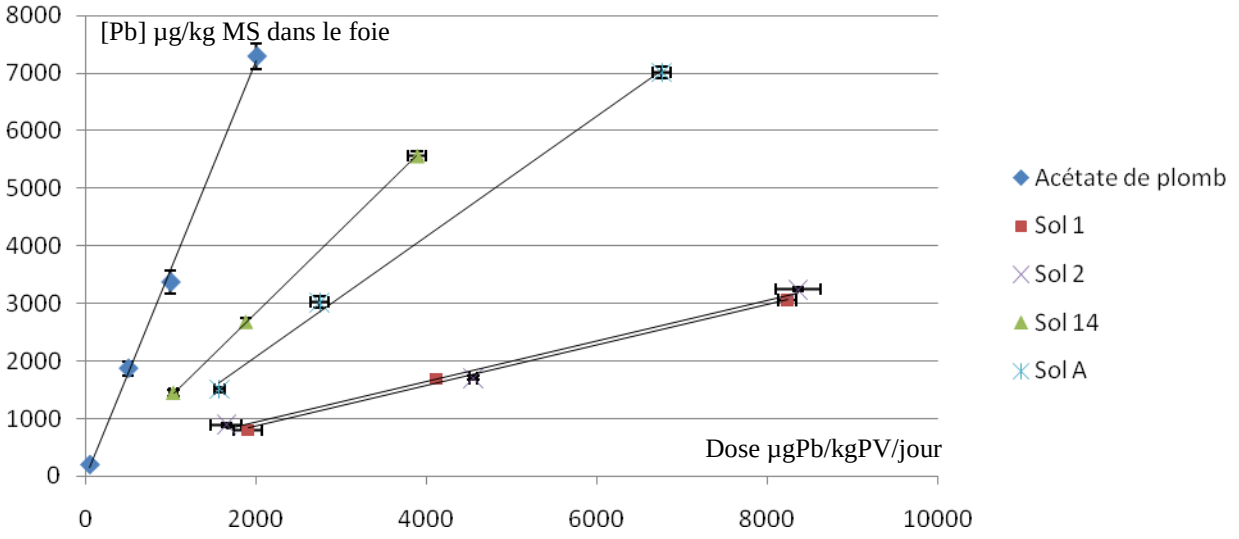
Courbes dose-réponse du plomb dans l'os

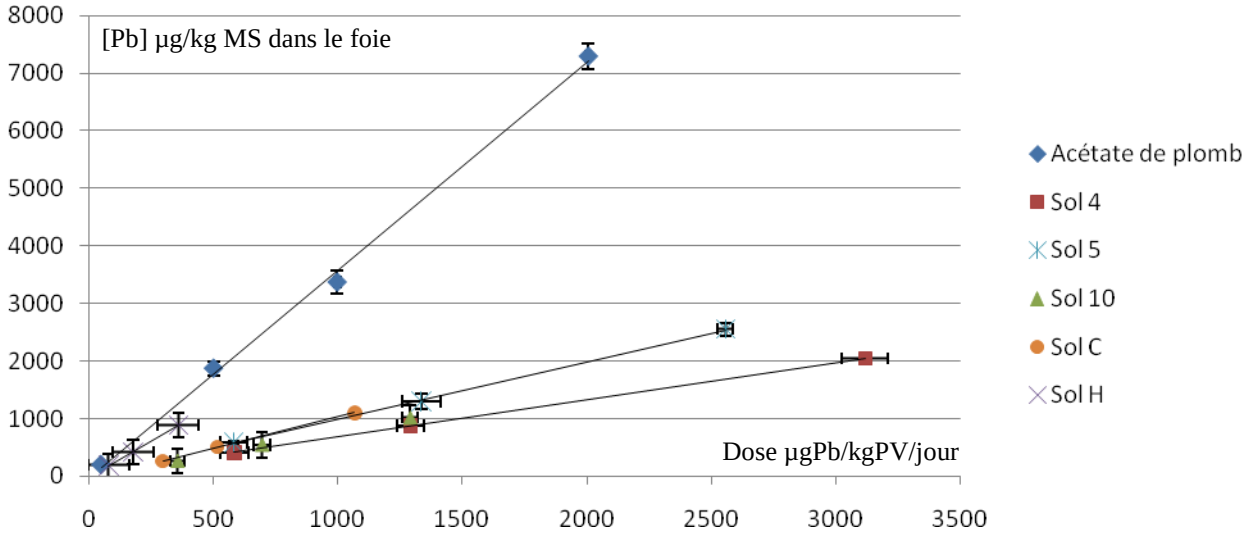


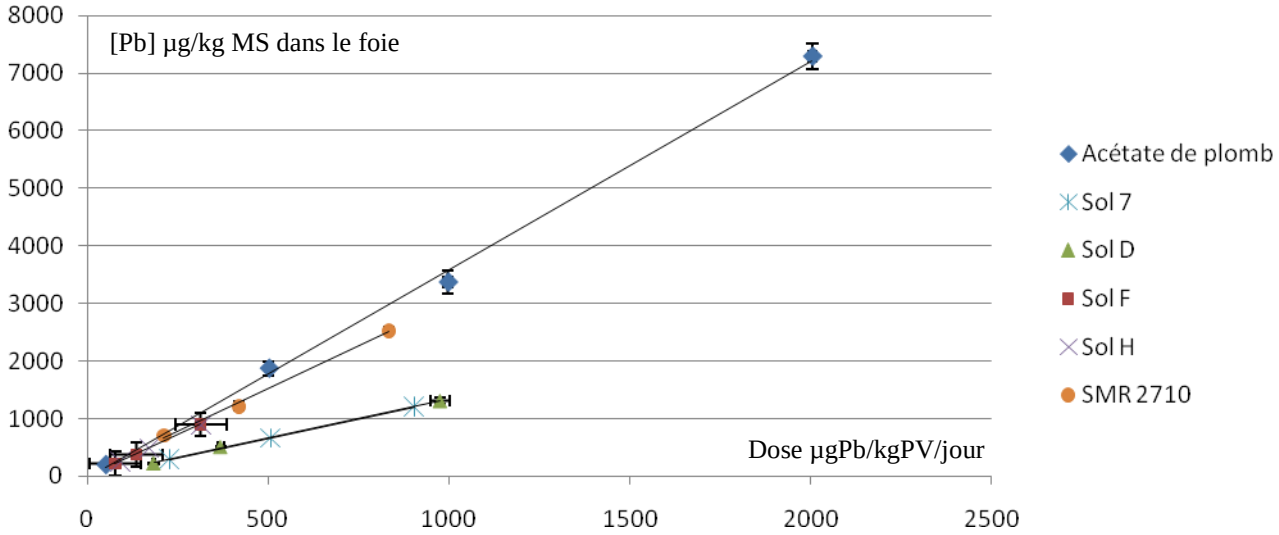




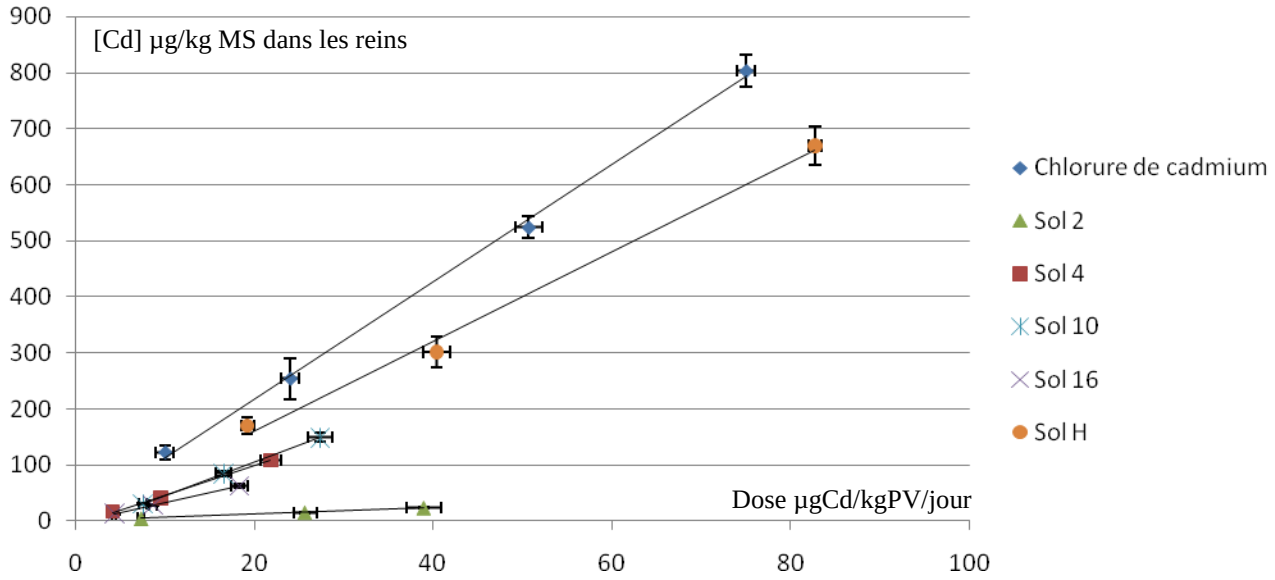
Courbes dose-réponse du plomb dans l'urine

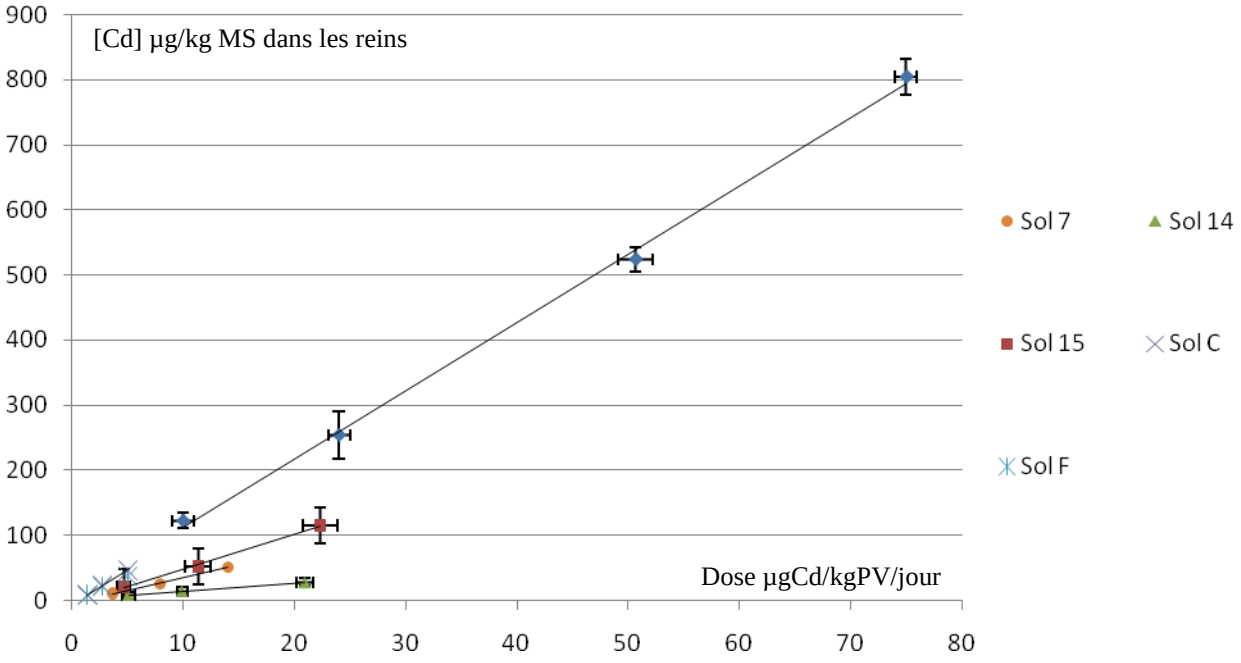




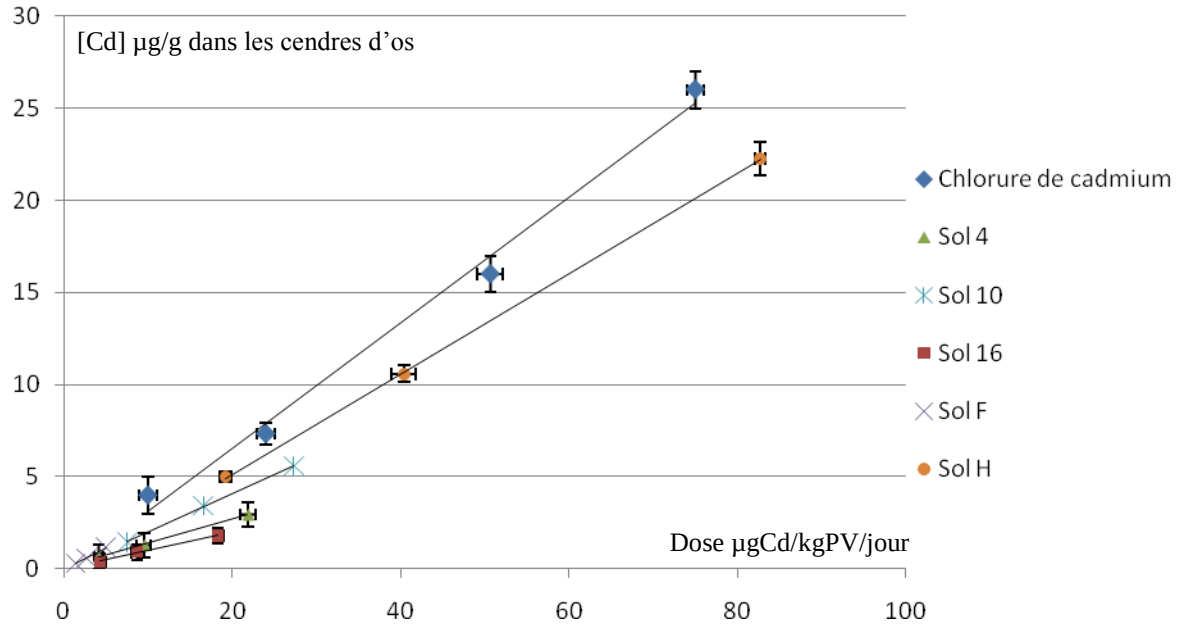


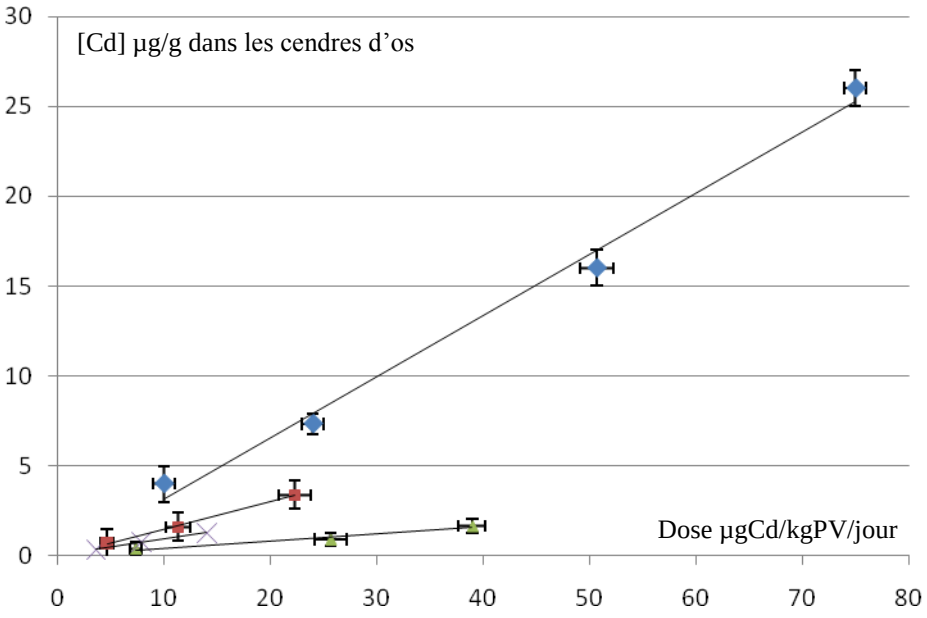
Courbes dose-réponse du plomb dans le foie



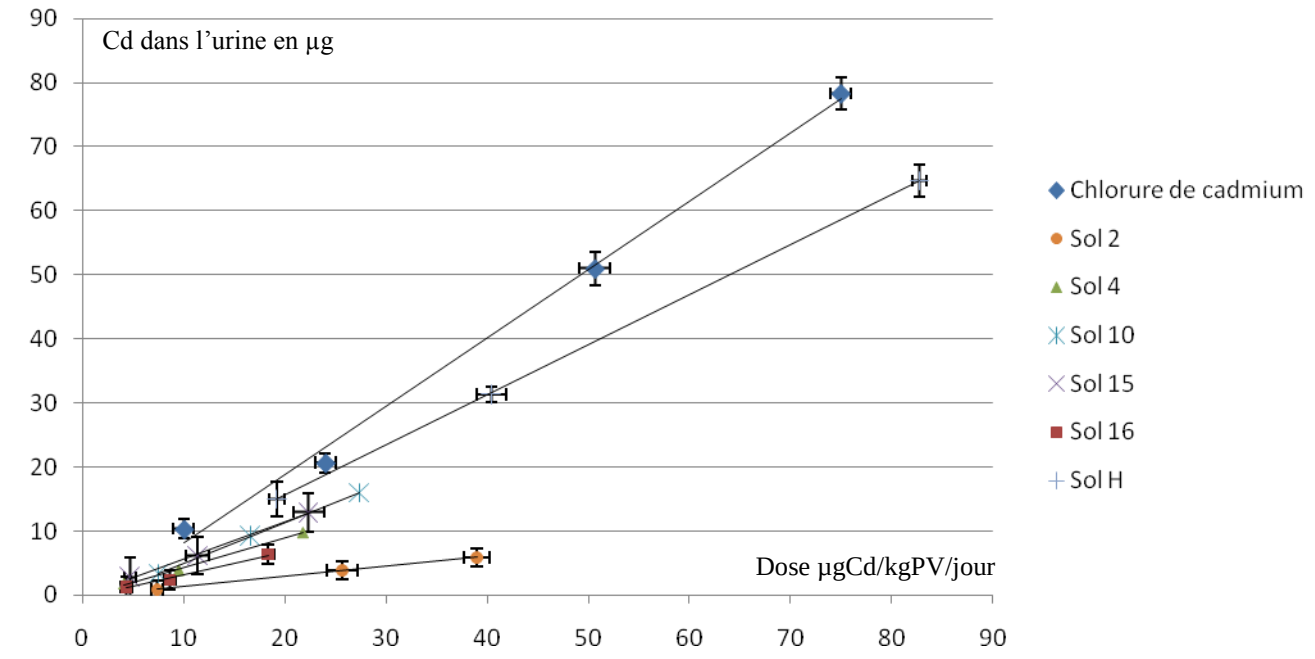


Courbes dose-réponse du cadmium dans le rein

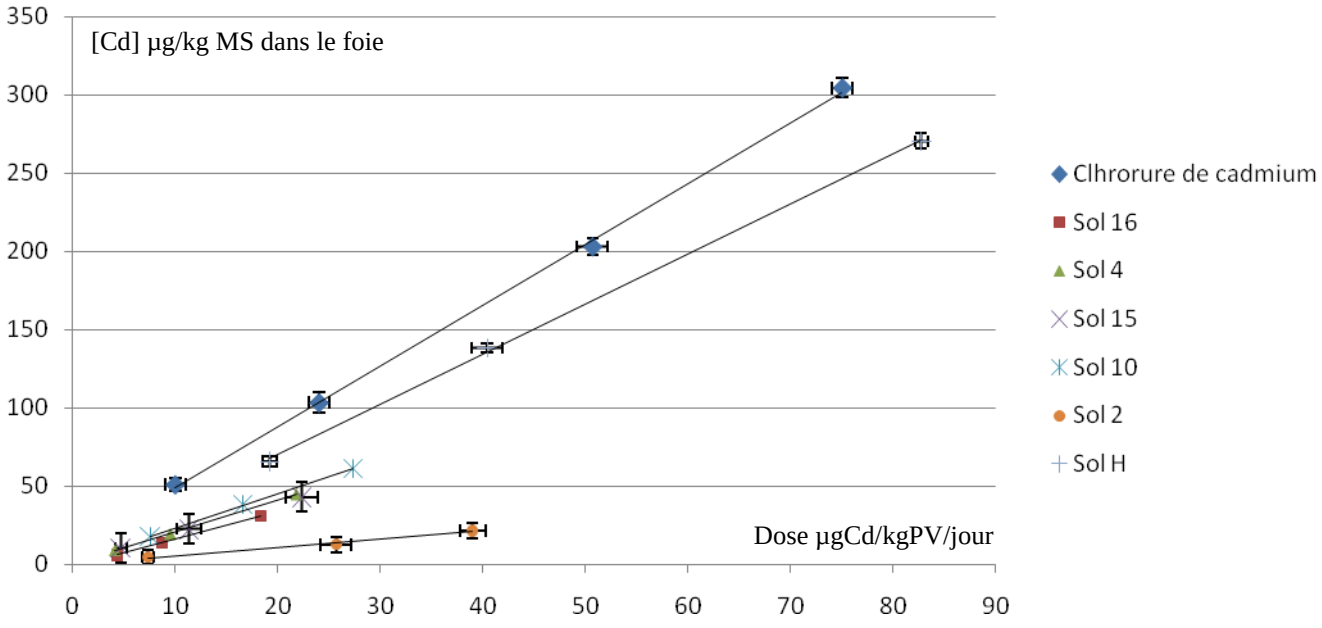




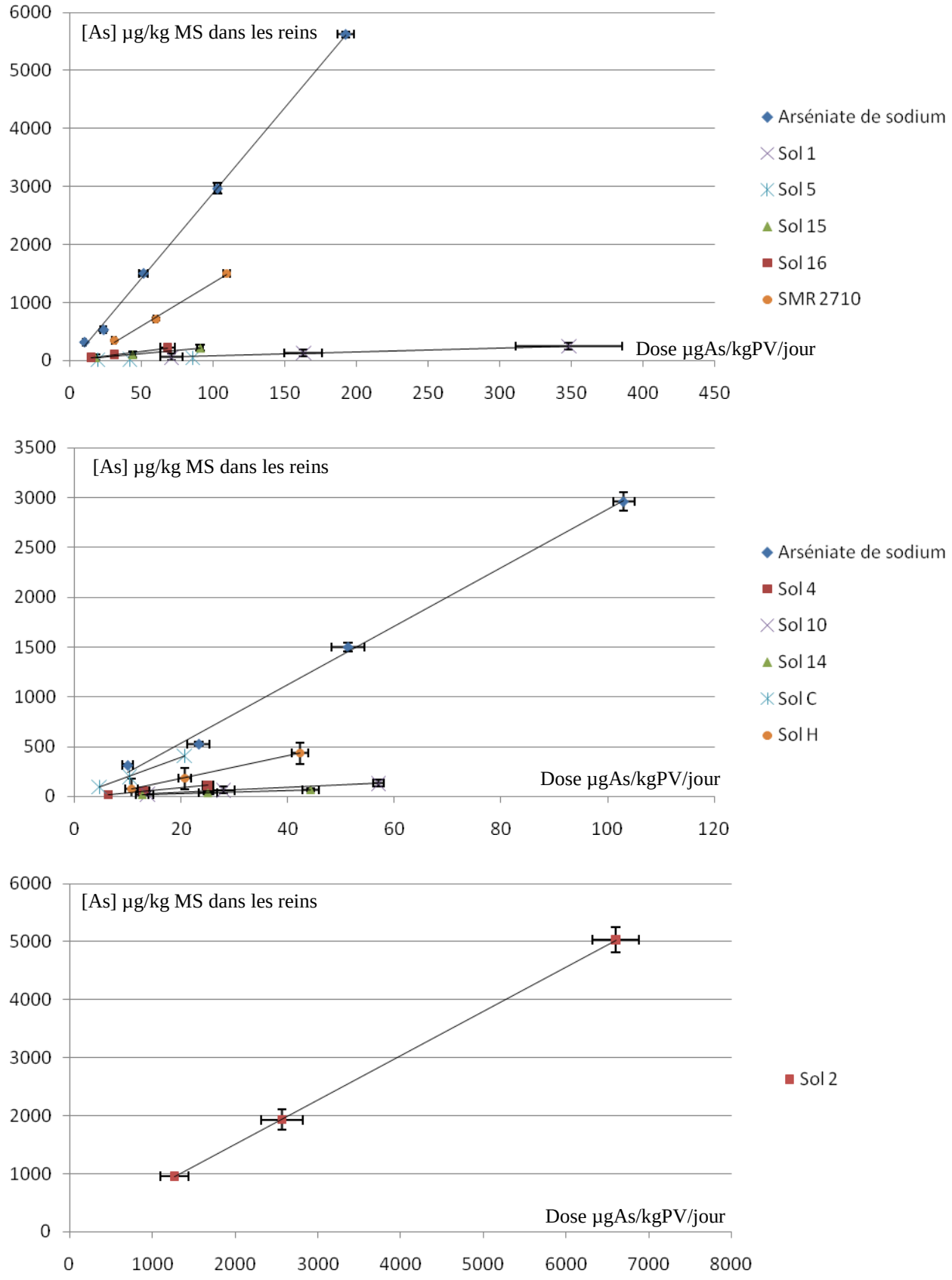
Courbes dose-réponse du cadmium dans l'os



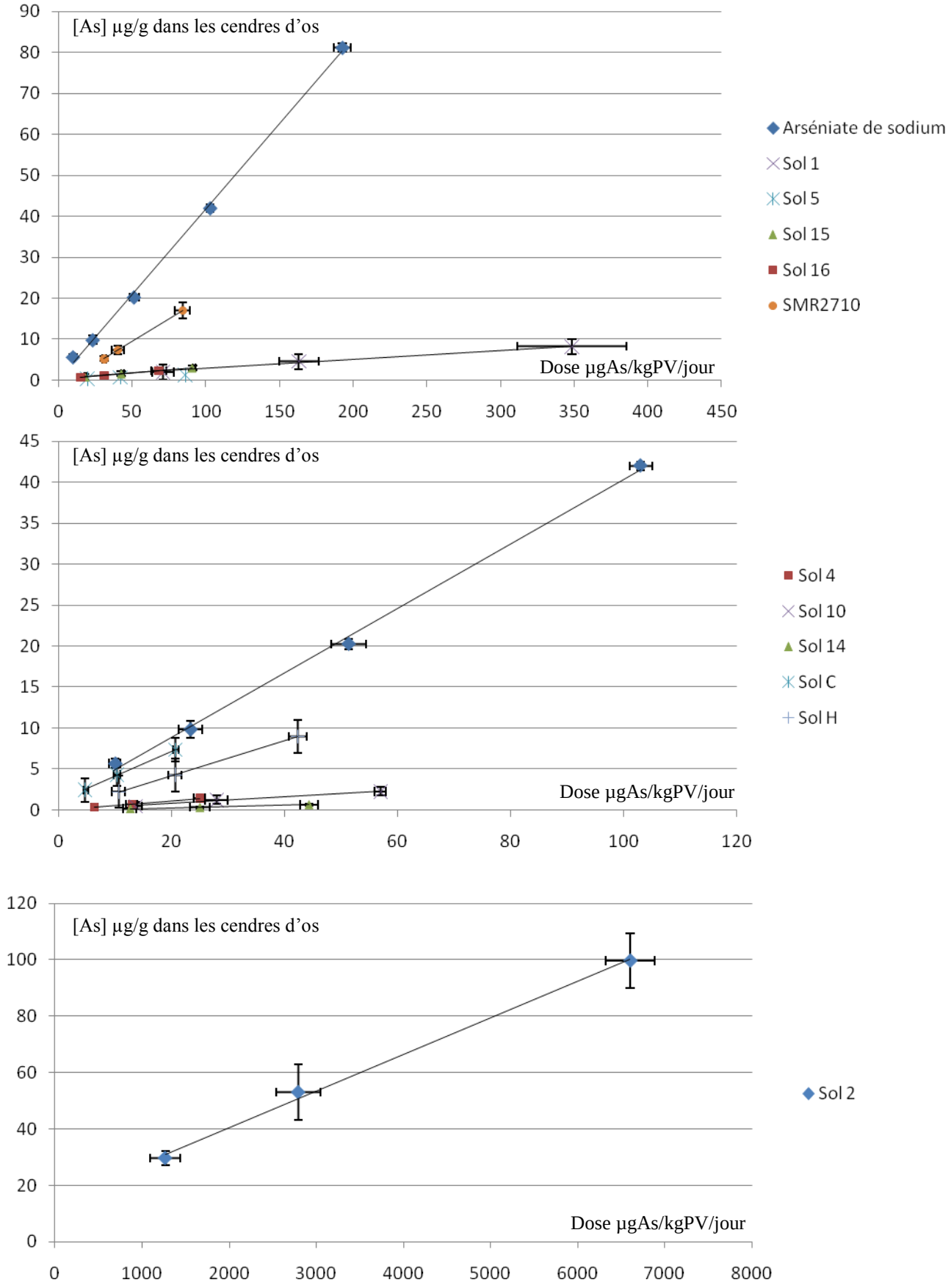
Courbes dose-réponse du cadmium dans l'urine



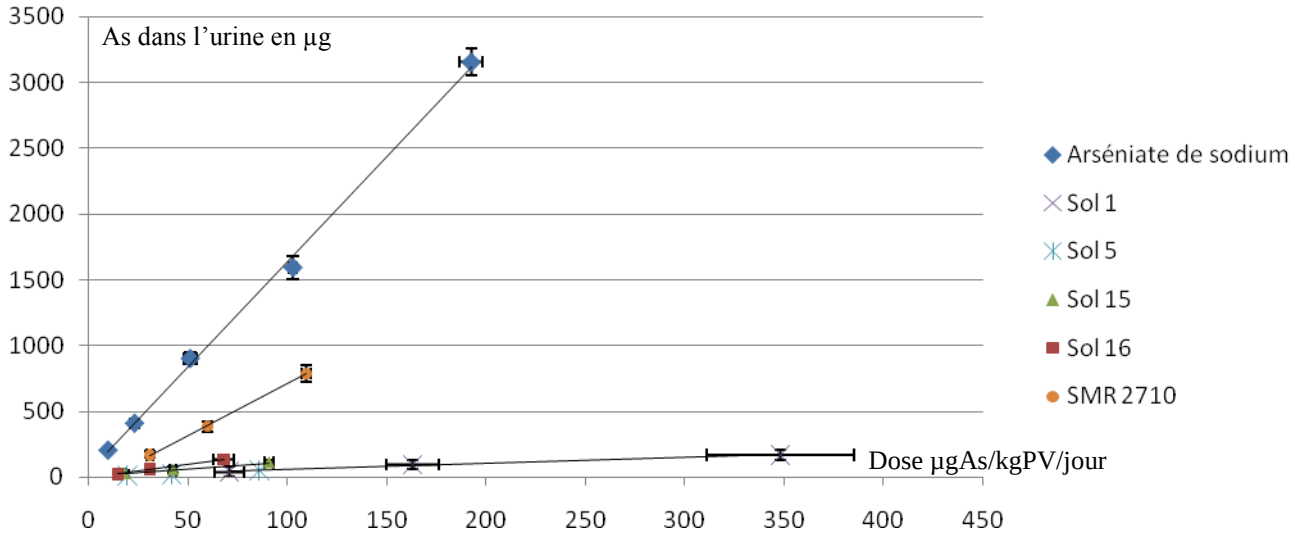
Courbes dose-réponse du cadmium dans le foie

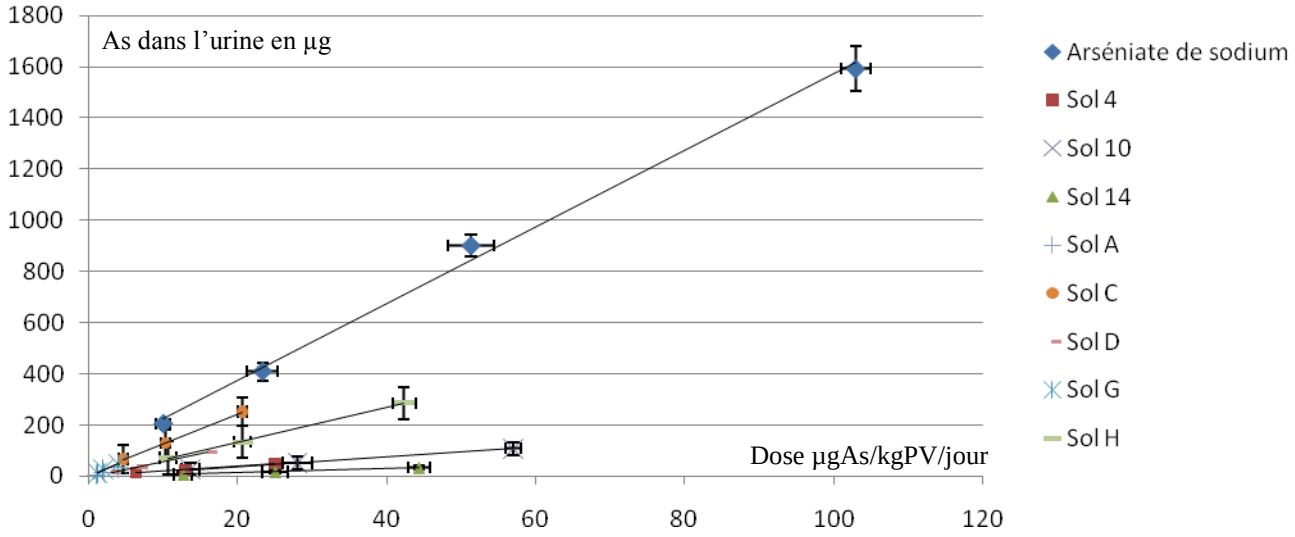


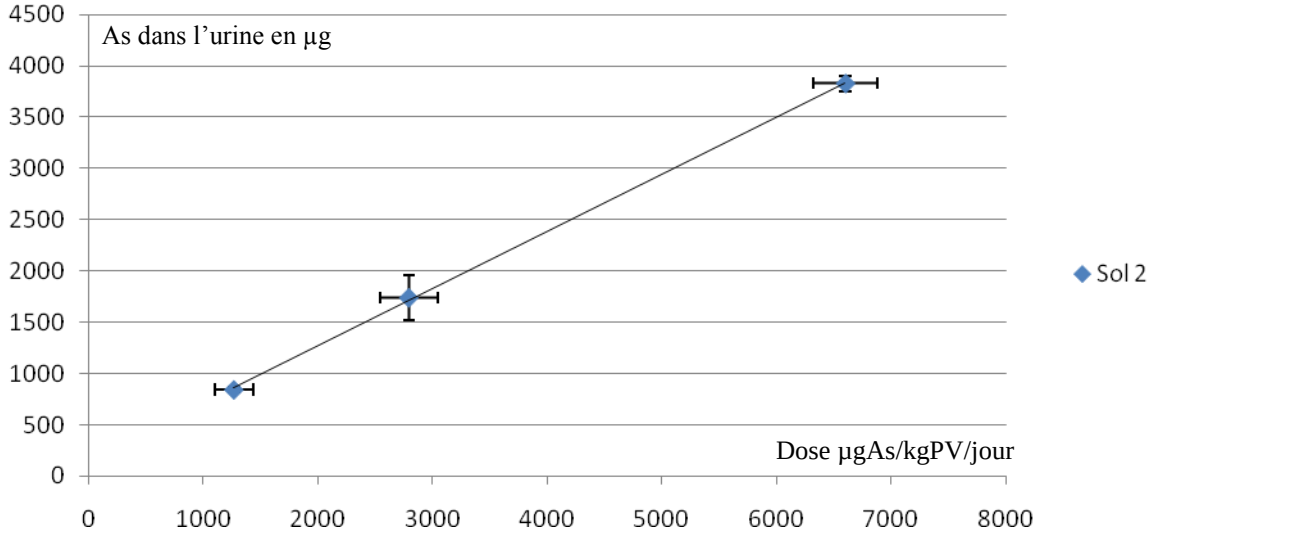
Courbes dose-réponse de l'arsenic dans le rein



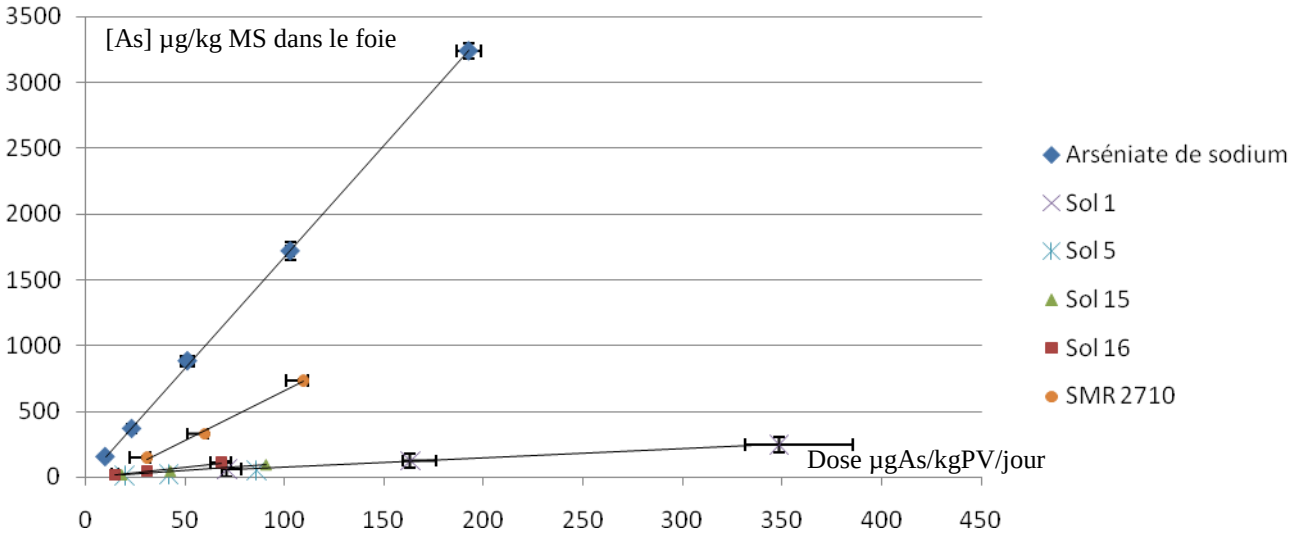
Courbes dose-réponse de l'arsenic dans l'os

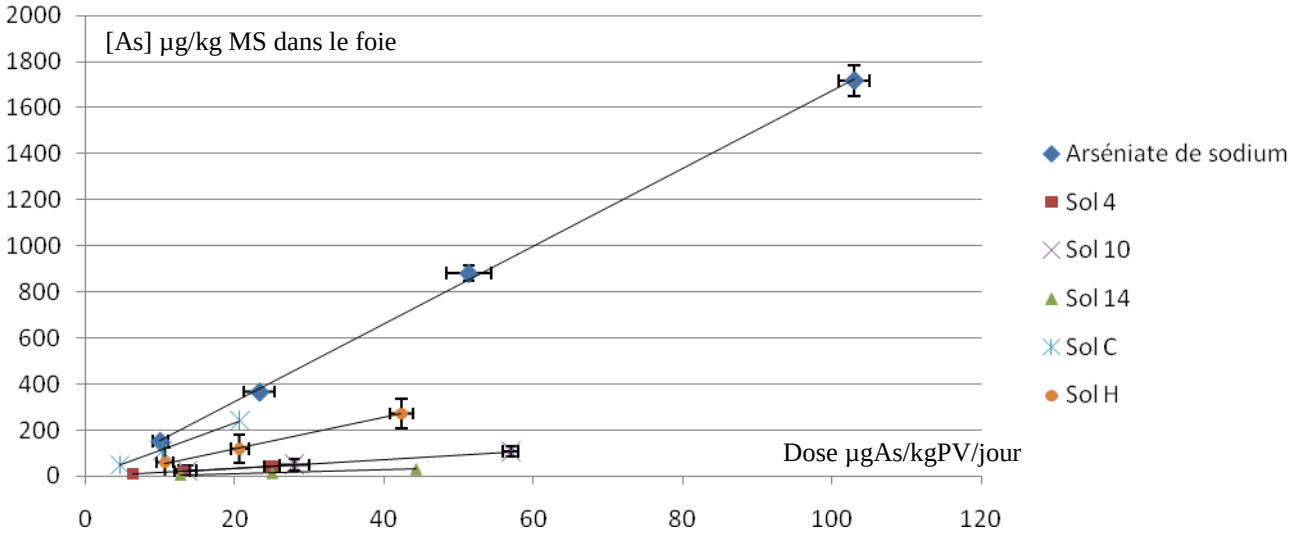


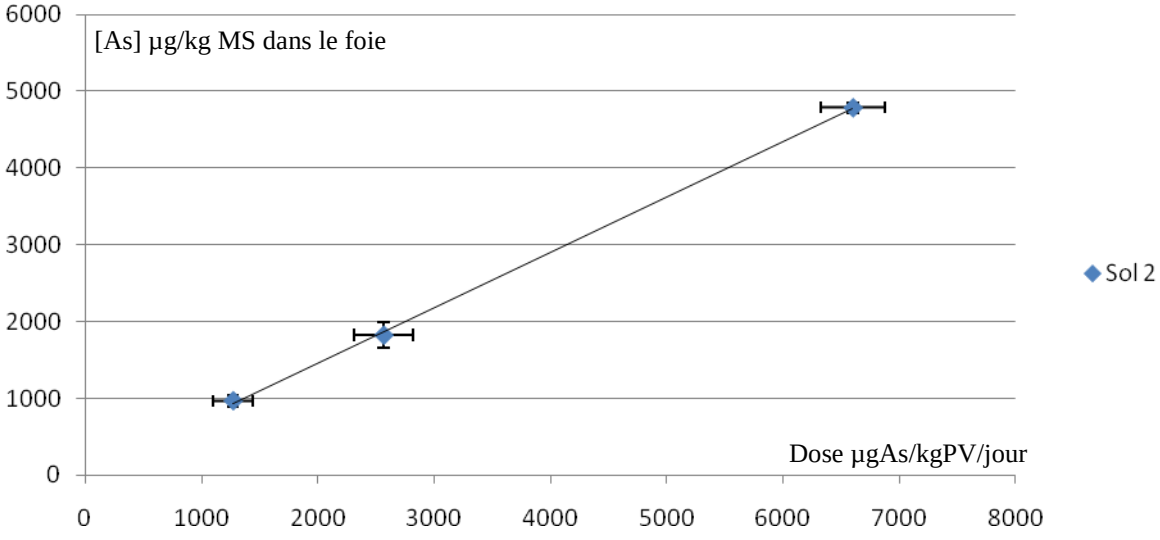




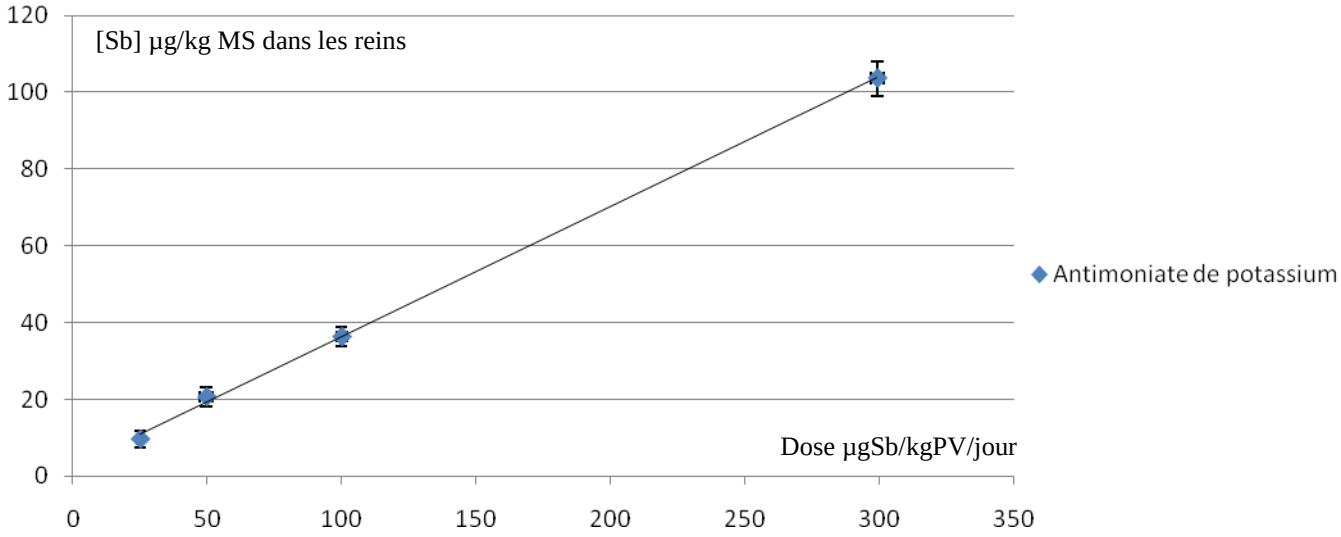
Courbes dose-réponse de l'arsenic dans l'urine

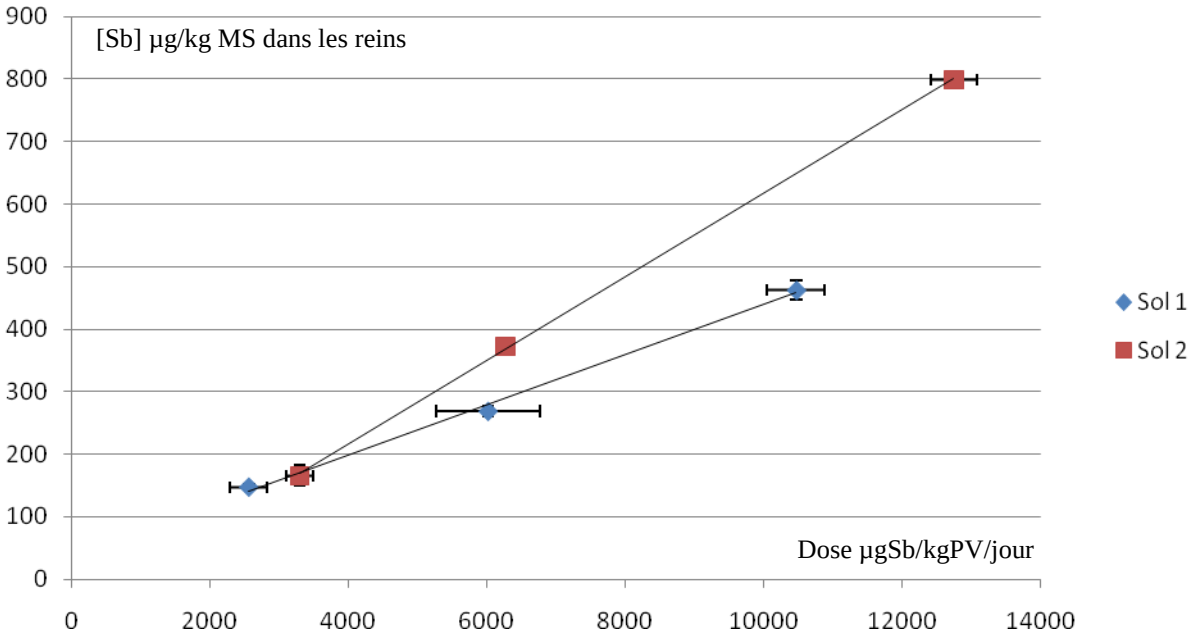




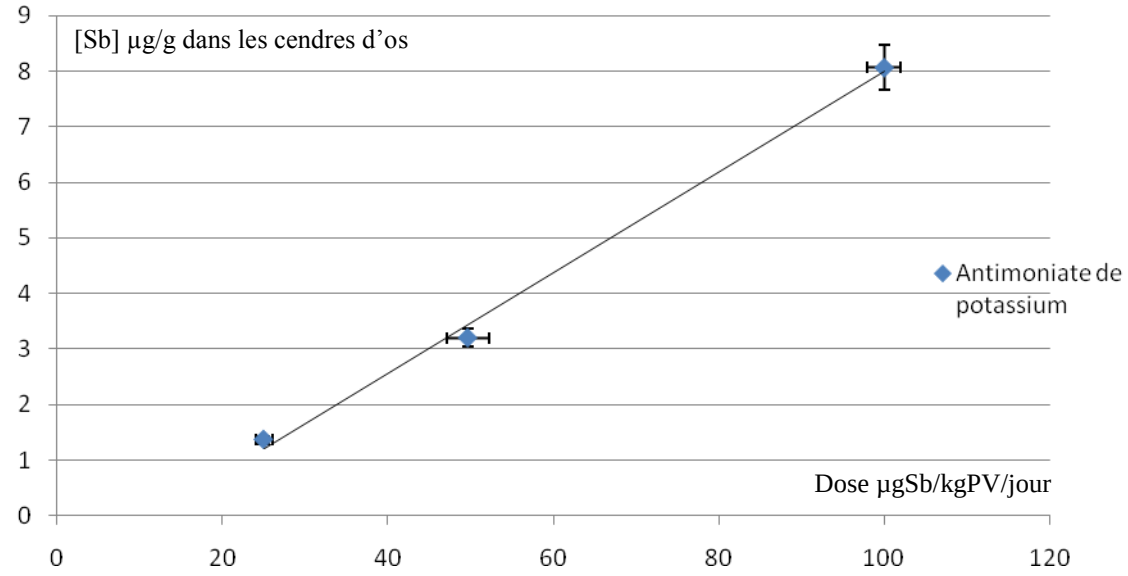


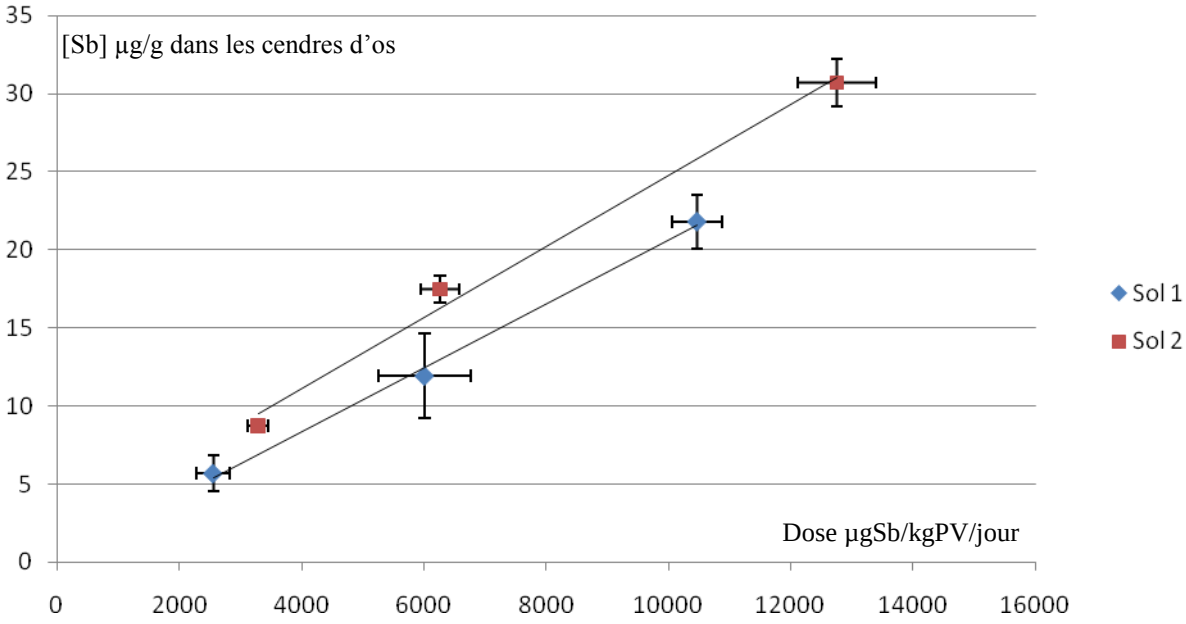
Courbes dose-réponse de l'arsenic dans le foie



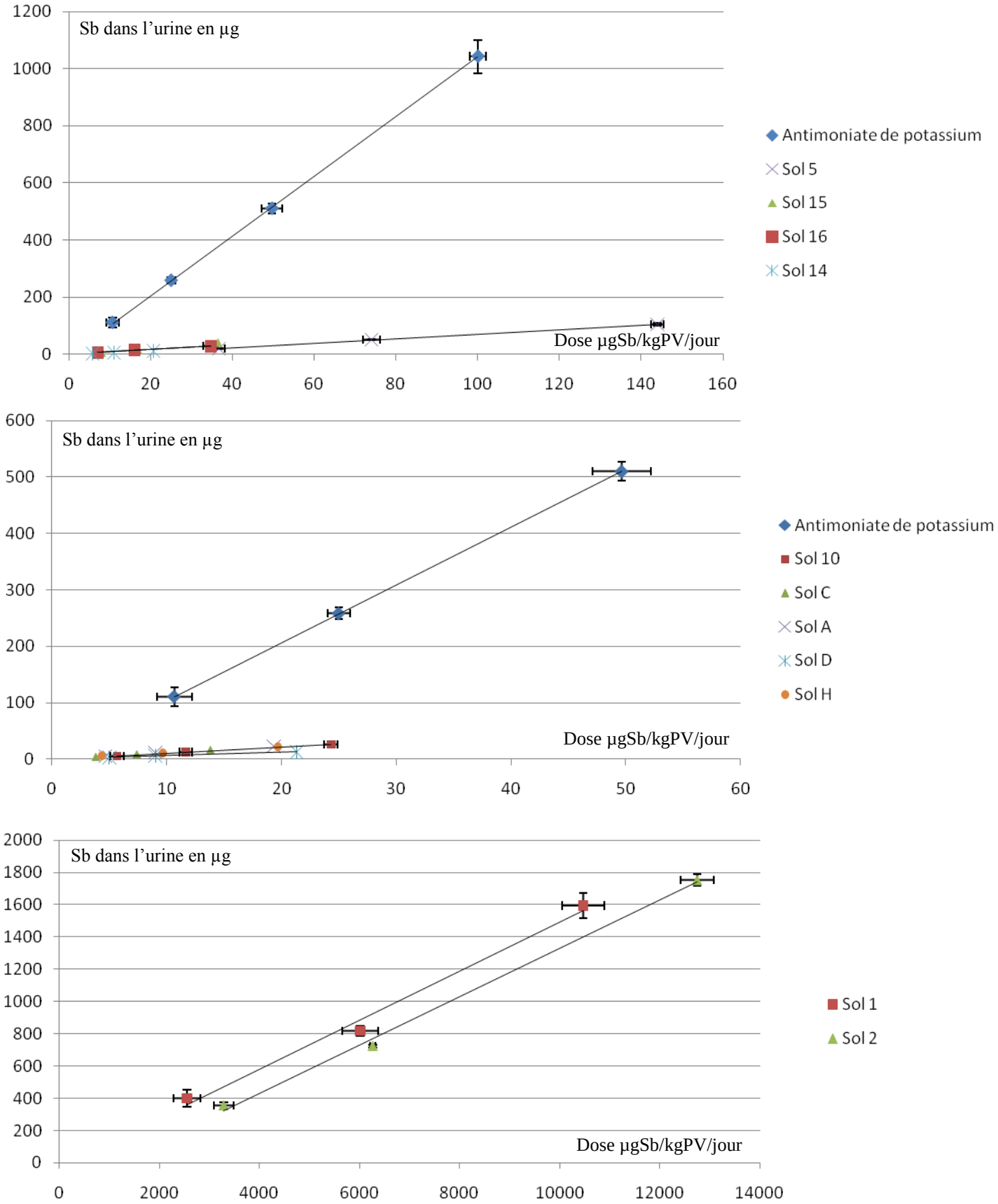


Courbes dose-réponse de l'antimoine dans le rein

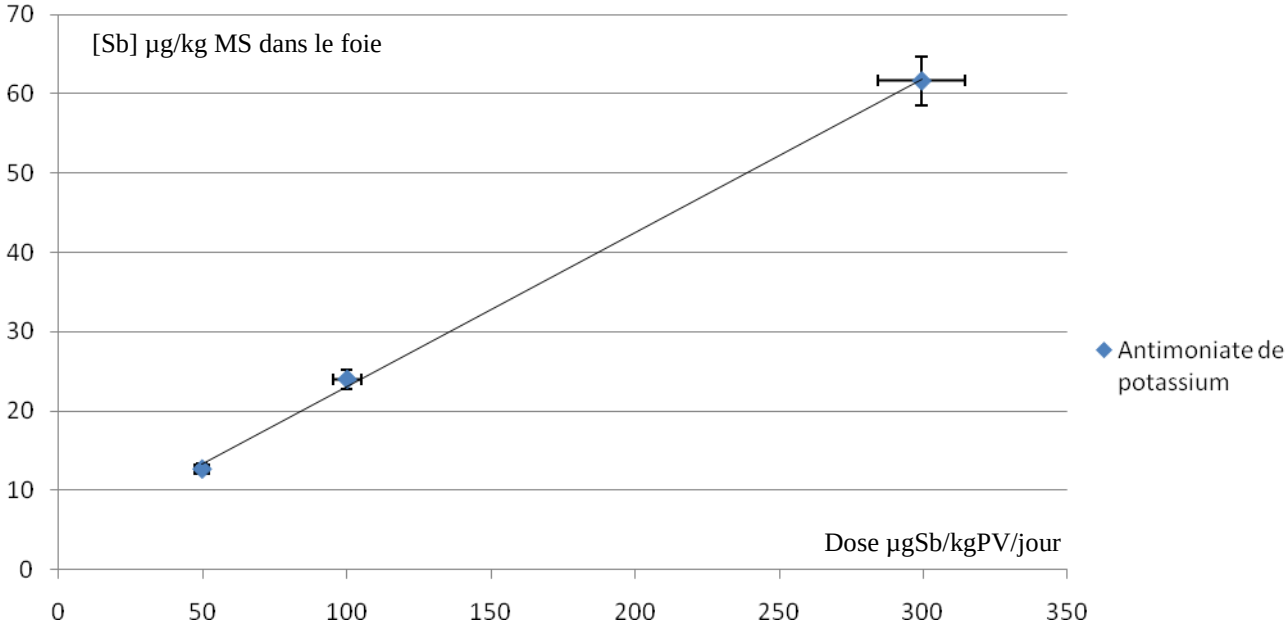


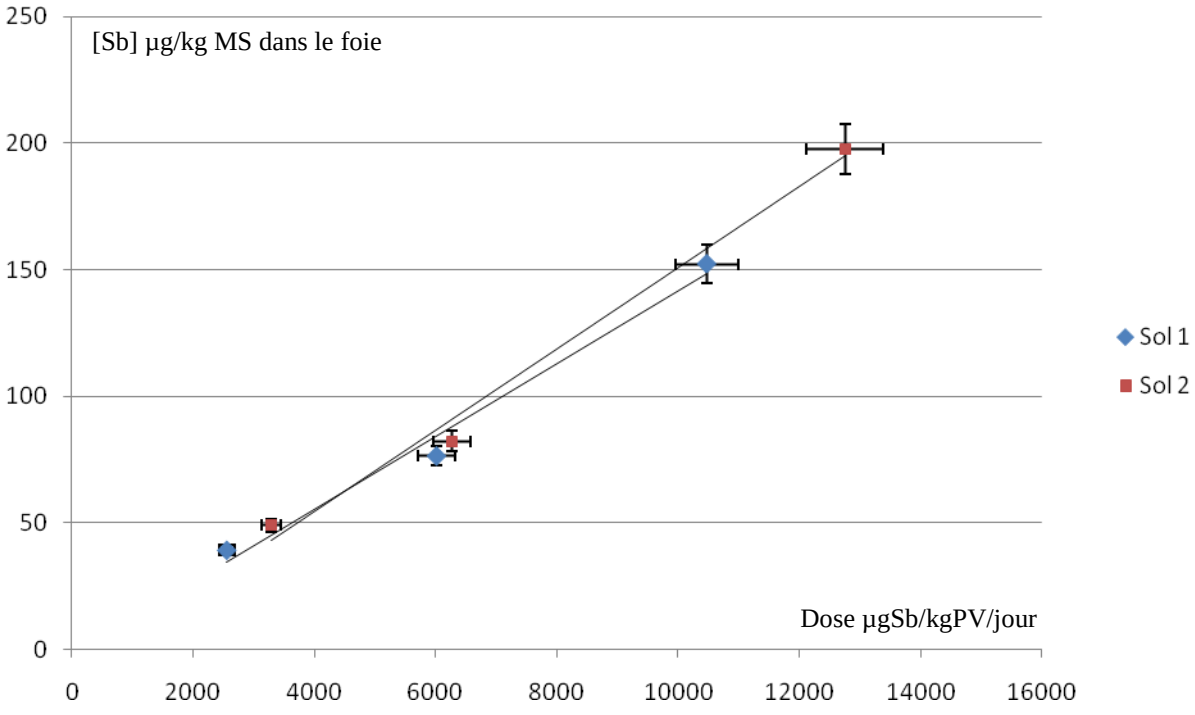


Courbes dose-réponse de l'antimoine dans l'os



Courbes dose-réponse de l'antimoine dans l'urine





Courbes dose-réponse de l'antimoine dans le foie

INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :
Monsieur Mark CAVE, Directeur Scientifique, Medical Geology Team Leader, Royaume-Uni

Monsieur Pierre-Marie BADOT, Professeur, Université de Franche-Comté, Besançon

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur CABOCHE Julien

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse intitulée :

"Validation d'un test de mesure de bioaccessibilité. Application à quatre éléments traces métalliques dans les sols : As, Cd, Pb et Sb"

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Sciences Agronomiques** »

Fait à Vandoeuvre, le 14 septembre 2009
Le Président de l'I.N.P.L.,
F. LAURENT



TEL. 33/03.83.59.59.59
FAX. 33/03.83.59.59.55

Résumé : Validation d'un test de mesure de bioaccessibilité. Application à 4 ETM dans les sols : As, Cd, Pb et Sb

La gestion des sites et sols pollués repose sur l'évaluation des expositions aux contaminants. Le retour d'expérience montre que les voies d'exposition directe, et notamment l'ingestion de terre pour les enfants, engendrent les niveaux de risque les plus élevés. Actuellement, en se basant sur la concentration totale d'un polluant dans le sol, l'évaluation des risques tend à être surprotectrice dans la mesure où seule une fraction de la substance peut pénétrer à l'intérieur de l'organisme. L'objectif de l'étude est de mettre en évidence que le test *in vitro* UBM (Unified Barge Method) de bioaccessibilité est pertinent pour estimer la fraction biodisponible des ETM dans les sols. Pour cela, il est nécessaire de démontrer que la solubilisation des contaminants dans le tractus gastro-intestinal est une étape limitante dans le processus de biodisponibilité et d'autre part que les mesures de bioaccessibilité sont corrélées aux mesures de biodisponibilité. Pour 15 sols sélectionnés sur trois sites contaminés différents, l'étude montre que la biodisponibilité est très variable pour le plomb (8% à 82%), le cadmium (12% à 91%) et l'arsenic (3% à 78%). Pour l'antimoine, les valeurs de biodisponibilité relative et de bioaccessibilité sont très faibles indépendamment des caractéristiques contrastées des sols (valeurs < 20%). De ce fait, ces conditions ne permettent pas de valider le test *in vitro* pour l'antimoine. Les résultats des corrélations, pour les trois autres contaminants, démontrent que la bioaccessibilité est l'étape limitante de la biodisponibilité et que le test UBM est pertinent pour estimer la bioaccessibilité de ces éléments dans les sols. Notre étude met également en évidence l'impact de la matrice sol sur les variations des valeurs de bioaccessibilité. Ainsi, il a été montré que la distribution des contaminants sur les différentes phases porteuses du sol est un paramètre majeur et robuste pour expliquer les variations de la bioaccessibilité pour l'ensemble des sols étudiés. Les résultats de l'étude mettent en lumière que le test *in vitro* UBM peut fournir une alternative possible aux investigations *in vivo* afin d'affiner les niveaux d'exposition des ETM suite à l'ingestion de sol.

Mots clés : biodisponibilité relative, bioaccessibilité, éléments métalliques, ingestion, sol, validation

Abstract: Validation of bioaccessibility test. Application to 4 metals in soils : As, Cd, Pb and Sb

The management of contaminated soil is based on the assessment of exposure of pollutants. The review shows that the direct routes of exposure, including soil ingestion for children, generate the highest risk levels. Currently, based on the total pollutant concentration in soil, risk assessment tends to be overestimate because only a fraction of the substance may penetrate into the body. The aim of the study is to demonstrate that *in vitro* UBM test (Unified Method Barge) is relevant to estimate the bioavailable fraction of metals in the soil by estimating the bioaccessible fraction. For this, it is necessary to show that the solubilization of contaminants in the gastrointestinal tract is a limiting step in oral bioavailability process and that bioaccessibility is correlated to bioavailability. For 15 soils selected on three different sites, the study shows that bioavailability is highly variable for lead (8% to 82%), cadmium (12% to 91%) and arsenic (3 % to 78%). For antimony, the relative bioavailability and bioaccessibility values are very low independently of the different soil characteristics (values <20%). Thus, these conditions do not allow to validate *in vitro* test for antimony. The results of correlations, for the three other contaminants, show that bioaccessibility is the limiting step in the bioavailability process and that UBM test is relevant to estimate the bioaccessibility. Our study also highlights the impact of the soil matrix on the variation of bioaccessibility values. Thus, it was shown that the distribution of contaminants in the different bearing phases of soil is a major and robust parameter to explain the variations of bioaccessibility for all soils studied. The results of the study highlight that the *in vitro* UBM test is a promising alternative to *in vivo* investigations to measure the exposure levels of metals after soil ingestion.

Keywords : Relative bioavailability, bioaccessibility, metals, ingestion, soil, validation