

**BIODISPONIBILITE ET BIOACCESSIBILITE DES POLLUANTS DANS LE  
CAS DES SOLS POLLUES  
ETAT DES CONNAISSANCES ET PISTES DE RECHERCHE**

**RAPPORT FINAL**  
Décembre 2011

**C. Dabin / A. Guignonnet-Sergent – ICF Environnement  
E. Algros / A.M. Charissou– IPL SEDE**

Créée en 1989 à l'initiative du Ministère en charge de l'Environnement, l'association RECORD – REseau COopératif de Recherche sur les Déchets – est le fruit d'une triple coopération entre industriels, pouvoirs publics et chercheurs. L'objectif principal de RECORD est le financement et la réalisation d'études et de recherches dans le domaine des déchets et des pollutions industrielles. Les membres de ce réseau (groupes industriels et organismes publics) définissent collégalement des programmes d'études et de recherche adaptés à leurs besoins. Ces programmes sont ensuite confiés à des laboratoires publics ou privés.

- En Bibliographie, ce document sera cité sous la référence :  
**RECORD**, Biodisponibilité et Bioaccessibilité dans le cas des sols pollués : état des connaissances et pistes de recherche, 2011, 138 pages, n°10-0671/1A.
- ✓ Ces travaux ont reçu le soutien de l'ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie) : [www.ademe.fr](http://www.ademe.fr)

## **RESUME**

Dans le cadre de la gestion des sols pollués, et notamment dans les évaluations quantitatives des risques sanitaires (EQRS), une des voies d'exposition étudiée est l'ingestion de sol. Actuellement, les évaluations de risque sanitaire considèrent, de façon sécuritaire, que la totalité d'une substance présente dans un sol ingéré par un individu, atteindra ses organes cibles et générera un effet toxique. Or, seule une fraction de la quantité ingérée atteint réellement la circulation sanguine (notion de biodisponibilité) et les organes cibles. Il s'agit donc d'étudier le facteur correctif à mettre en œuvre dans le calcul de la dose d'exposition afin de tenir compte des variations de la relation dose-effet associée à la matrice sol étudiée.

Des travaux de recherche sont actuellement menés afin d'approcher la valeur de biodisponibilité par des tests *in vitro* de bioaccessibilité, moins coûteux à mettre en place que les tests *in vivo* de biodisponibilité. La bioaccessibilité correspond à la fraction de la quantité ingérée qui, après dissolution, est disponible à l'absorption.

La présente étude clarifie les définitions de la biodisponibilité et la bioaccessibilité. Dans le cadre de l'ingestion de sol pollué par l'Homme, un état des connaissances internationales est dressé : utilisation actuelle de ces notions dans la gestion des sites et sols pollués, investigations à mener, analyse (caractéristiques des différents tests *in vitro* de bioaccessibilité, comparatif,...), résultats de bioaccessibilité, modélisation de la biodisponibilité, méthodologie pour l'intégration de ces notions dans les études à visée sanitaire. Enfin, un bilan est présenté afin de proposer une méthode d'intégration de ces paramètres dans les EQRS en France.

## **MOTS CLES**

Bioaccessibilité, ingestion, sol, test *in vitro*, facteur d'absorption relatif, évaluation des risques sanitaires.

-----

## **SUMMARY**

In the management of contaminated soils, ingestion is an exposure pathway utilised in health risk assessments. Currently, as a margin of safety, 100% of the substance in the soil ingested is considered to reach the target organ and to have toxic effects. However, only a fraction of the ingested amount actually enters the bloodstream (bioavailability) and reaches the target organs. Therefore, in order to be more realistic, an adjustment in the exposure dose calculation must be done which considers the variation of the dose-effect in relation due to the matrix.

Bioaccessibility is the fraction of an ingested compound which is soluble in the gastrointestinal tract, and which is then available for absorption. Bioaccessibility *in vitro* methods are currently being developed to approximate bioavailability. These methods are less expensive and easier to implement than bioavailability *in vivo* methods.

This study clarifies the definitions of bioavailability and bioaccessibility. The most up-to-date scientific knowledge is presented, including: current use of these findings in risk assessments related to contaminated land; soil investigations; soil analysis (different *in vitro* methods and their comparison); bioaccessibility results; bioavailability estimates; and current methods to incorporate these findings into human health risk assessments. Finally, after a summary of the previous findings, a method is proposed which considers bioavailability/bioaccessibility in human health risk assessments in France.

## **KEY WORDS**

Bioaccessibility, soil ingestion, *in vitro* method, relative absorption factor, human health risk assessment

## **SOMMAIRE**

<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>11</b>
<b>I. CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE .....</b>	<b>12</b>
<b>II. METHODOLOGIE DE RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>13</b>
<b>III. NOTIONS DE BIODISPONIBILITE ET BIOACCESSIBILITE : DEFINITIONS ET UTILISATIONS ACTUELLES.....</b>	<b>13</b>
<b>III-1. Biodisponibilité et bioaccessibilité environnementale et toxicologique .....</b>	<b>13</b>
<b>III.1.1. Définitions générales .....</b>	<b>13</b>
<b>III.1.2. Méthodes de mesure de la biodisponibilité et bioaccessibilité d'un contaminant dans un sol .....</b>	<b>17</b>
<b>III-2. Exposition de l'Homme par ingestion de sol .....</b>	<b>18</b>
<b>III.2.1. Définitions de la biodisponibilité et bioaccessibilité toxicologiques.....</b>	<b>18</b>
<i>III.2.1.1 Bioaccessibilité et biodisponibilité absolues .....</i>	<i>18</i>
<i>III.2.1.2 Bioaccessibilité et Biodisponibilité relatives.....</i>	<i>24</i>
<b>III.2.2. Mesure de la biodisponibilité et bioaccessibilité toxicologiques .....</b>	<b>25</b>
<b>III-3. Utilisations actuelles de ces notions .....</b>	<b>27</b>
<b>III.3.1. Les différents types d'études d'exposition .....</b>	<b>27</b>
<b>III.3.2. Evaluation Quantitative des Risques Sanitaires par ingestion de sol .....</b>	<b>28</b>
<b>III.3.3. Point sur l'intégration de ces notions dans les études sanitaires .....</b>	<b>30</b>
<i>III.3.3.1 Au niveau international : .....</i>	<i>30</i>
<i>III.3.3.2 Etats-Unis : .....</i>	<i>30</i>
<i>III.3.3.3 Australie : .....</i>	<i>31</i>
<i>III.3.3.4 Canada :.....</i>	<i>31</i>
<i>III.3.3.5 Europe : .....</i>	<i>31</i>
<b>IV. ETAT DE L'ART INTERNATIONAL EN MATIERE DE BIODISPONIBILITE ET BIOACCESSIBILITE D'UN CONTAMINANT DANS UN SOL .....</b>	<b>35</b>
<b>IV-1. Investigations sur site.....</b>	<b>35</b>
<b>IV.1.1. Etude du site d'exposition .....</b>	<b>35</b>
<i>IV.1.1.1 Etude historique et documentaire .....</i>	<i>36</i>
<i>IV.1.1.2 Diagnostic initial et approfondi.....</i>	<i>36</i>
<b>IV.1.2. Echantillonnage.....</b>	<b>38</b>
<b>IV-2. Analyse.....</b>	<b>39</b>
<b>IV.2.1. Essais <i>in vivo</i> : mesure de la biodisponibilité.....</b>	<b>40</b>
<i>IV.2.1.1 Généralités.....</i>	<i>40</i>
<i>IV.2.1.2 Les modèles animaux utilisés .....</i>	<i>41</i>

IV.2.2. Essais <i>in vitro</i> : mesure de la bioaccessibilité .....	42
IV.2.2.1 Généralités.....	43
IV.2.2.2 Présentation des essais.....	45
IV.2.2.3 Comparatif des protocoles.....	47
IV.2.2.4 Validation des protocoles.....	69
<b>IV-3. Résultats et Modélisations .....</b>	<b>80</b>
<b>IV.3.1. Principaux résultats en termes de bioaccessibilité .....</b>	<b>81</b>
IV.3.1.1 Principaux résultats de bioaccessibilité concernant les contaminants inorganiques .....	81
IV.3.1.2 Principaux résultats de bioaccessibilité concernant les contaminants organiques .....	83
IV.3.1.3 Paramètres sensibles dans la détermination de la bioaccessibilité .....	84
<b>IV.3.2. Modélisations .....</b>	<b>87</b>
IV.3.2.1 Modélisation de la bioaccessibilité.....	88
IV.3.2.2 Modélisation de la biodisponibilité .....	94
<b>IV-4. Etude .....</b>	<b>97</b>
<b>IV.4.1. Généralités.....</b>	<b>97</b>
<b>IV.4.2. Etat des connaissances en matière de méthodologie d'intégration         des notions de bioaccessibilité/biodisponibilité dans les études         sanitaires.....</b>	<b>98</b>
IV.4.2.1 Méthodologies existantes .....	98
IV.4.2.2 Utilisation de données bibliographiques .....	99
IV.4.2.3 Utilisation des résultats des tests <i>in vitro</i> de bioaccessibilité .....	100
<b>V. BILAN ET PROPOSITIONS.....</b>	<b>106</b>
<b>V-1. Bilan.....</b>	<b>106</b>
<b>V.1.1. Faisabilité technique .....</b>	<b>106</b>
V.1.1.1 Investigations.....	106
V.1.1.2 Analyse .....	106
<b>V.1.2. Faisabilité méthodologique .....</b>	<b>115</b>
V.1.2.1 Quelles données utiliser ?.....	115
V.1.2.2 Estimation du Facteur d'Absorption Relative (FAR) .....	116
<b>V-2. Propositions.....</b>	<b>116</b>
<b>V.2.1. Analyse .....</b>	<b>116</b>
<b>V.2.2. Méthodologie .....</b>	<b>118</b>
<b>VI. AXES DE DEVELOPPEMENT ET DE RECHERCHE.....</b>	<b>126</b>
<b>VI-1. La bioaccessibilité d'un contaminant par ingestion de sol .....</b>	<b>126</b>
<b>VI-2. Application à d'autres milieux.....</b>	<b>128</b>
<b>VI-3. Application à d'autres voies : l'inhalation .....</b>	<b>128</b>
<b>VI-4. La bioaccessibilité comme indicateur de dépollution.....</b>	<b>128</b>
<b>VI-5. Disponibilité environnementale et biodisponibilité toxicologique.....</b>	<b>129</b>
<b>VII. CONCLUSION .....</b>	<b>130</b>

## **ANNEXES**

ANNEXE 1 : Fond documentaire.....	138
ANNEXE 2 : Descriptions des protocoles des essais de bioaccessibilité avec analogues gastro-intestinaux.....	138
ANNEXE 3 : Variabilité de certaines caractéristiques de 5 procédures issues de l'essai PBET (exemple) .....	138
ANNEXE 4 : Principaux résultats de bioaccessibilité des molécules inorganiques dans les sols .....	138
ANNEXE 5 : Principaux résultats de bioaccessibilité des molécules organiques dans les sols.....	138
ANNEXE 6 : Paramètres influençant les résultats des tests de bioaccessibilité .....	138
ANNEXE 7 : Différentes méthodes d'intégration de la bioaccessibilité/biodisponibilité dans les évaluations de risques sanitaires .....	138

## TABLEAUX

Tableau 1 : Principales études <i>in vivo</i> publiées déterminant la biodisponibilité relative des éléments traces métalliques dans les sols (extrait de la Thèse de J. Caboche (18)) .....	25
Tableau 2 : Liste des tests physiologiques simples et avec analogues gastro-intestinaux de mesure de la bioaccessibilité recensés dans la littérature. ....	42
Tableau 3 : Principales caractéristiques des processus se déroulant dans le tube gastro-intestinal de l'Homme (d'après Caboche (18)) et <a href="http://www.cap-sciences.net/upload/digestion.pdf">http://www.cap-sciences.net/upload/digestion.pdf</a> ; consulté le 21/03/2011) .....	45
Tableau 4 : Principales caractéristiques des essais physiologiques de bioaccessibilité <i>in vitro</i> avec analogues gastro-intestinaux. ....	49
Tableau 5 : Composition des solutions digestives des tests physiologiques de bioaccessibilité <i>in vitro</i> avec analogues gastro-intestinaux (si non précisé, unité en mg/L).....	50
Tableau 6 : Illustration des différences ou similitudes en fonction des éléments des bioaccessibilités entre les phases gastriques et intestinales des essais <i>in vitro</i> , y compris pour des formes de référence. ....	55
Tableau 7 : Résumé des constituants composant les solutions digestives des essais de bioaccessibilité. ....	59
Tableau 8 : Aliments utilisés dans certains essais de bioaccessibilité. ....	65
Tableau 9 : Ensemble des équations rencontrées dans la littérature des droites de corrélations obtenues entre la biodisponibilité relative (RBD) et la bioaccessibilité absolue ou relative (BAc) .....	72
Tableau 10 : Equations des droites de corrélation <i>in vivo</i> / <i>in vitro</i> (R/R, modèle porcin) obtenues pour le test UBM au cours de l'étude de Wragg <i>et al.</i> (2011) (69). ....	75
Tableau 11 : Résultats des tests <i>in vitro</i> pour le plomb sur le sol de référence Bunker Hill (2924 mgPb/kg sol PS) et comparaison aux résultats <i>in vivo</i> (tirés des travaux de Maddaloni <i>et al.</i> , 1998), d'après Van de Wiele <i>et al.</i> (68). ....	76
Tableau 12 : Exemples de valeurs de coefficients de variation relatives à la répétabilité de différents essais de bioaccessibilité.....	77
Tableau 13 : Variations intra- et inter-laboratoires et, équations des droites de corrélation entre bioaccessibilité <i>in vitro</i> et biodisponibilité <i>in vivo</i> (modèle porc) obtenues pour le test UBM au cours de l'étude de Wragg <i>et al.</i> (69).....	78
Tableau 14 : Variabilité des valeurs de bioaccessibilité des éléments inorganiques .....	82
Tableau 15 : Variabilité des valeurs de bioaccessibilité des molécules organiques. ....	83
Tableau 16 : Impact de l'historique de contamination et de certains paramètres physico-chimiques du sol sur la biodisponibilité des éléments métalliques dans les sols (extrait de Caboche <i>et al.</i> (18)) .....	86
Tableau 17 : Equations reliant les propriétés du sol à la bioaccessibilité, par contaminant (%BA = bioaccessibilité en pourcentage de la concentration totale du contaminant) .....	89
Tableau 18 : Matrice de corrélation Pearson (r) entre la bioaccessibilité de certains métaux (plomb, cadmium, arsenic et antimoine) et les phases d'extractions séquentielles (d'après Caboche (18)) .....	91
Tableau 19 : Relation entre la bioaccessibilité <i>in vitro</i> (test UBM) et les fractions extraites par extractions séquentielle (88) .....	93
Tableau 20 : Comparatif des équations de corrélation obtenues avec le test SBRC .....	95
Tableau 21 : Equations rencontrées dans la littérature pour la modélisation de la biodisponibilité relative (RBA) à partir des caractéristiques des sols .....	96
Tableau 22 : Valeur de biodisponibilité en fonction du taux de matière organique des sols pour le plomb, selon le RIVM.....	99

Tableau 23 : Valeur de biodisponibilité en fonction de la spéciation/forme pour l'arsenic et le plomb, selon la classification semi-quantitative de l'US EPA. ....	100
Tableau 24 : Matrices et animaux utilisés dans les études de biodisponibilité (avec $r^2 > 0,6$ ) et ceux utilisés dans les études toxicologiques. ....	103
Tableau 25 : Tests de bioaccessibilité pouvant être distingués pour leur pertinence élevée ou modérée concernant des critères de représentativité physiologique et de faisabilité technique. ....	108
Tableau 26 : Equations de corrélations <i>in vivo/in vitro</i> ayant un coefficient de détermination $r^2 > 0,6$ (d'après le Tableau 9 recensant l'ensemble des équations disponibles) ....	110
Tableau 27 : Rappel des coefficients $r^2$ obtenus pour les droites de corrélations entre les résultats du test UBM et les biodisponibilités mesurées <i>in vivo</i> , pour l'arsenic. ....	114
Tableau 28 : Estimation du FAR par polluant et par test (application du logigramme pour l'arsenic, le plomb et le cadmium). ....	123



## FIGURES

Figure 1 :	De la concentration totale dans le sol à l'effet (modifié d'après la norme EN ISO 17402) (3).....	16
Figure 2 :	Méthodes d'évaluation de la biodisponibilité (d'après la norme EN ISO 17402 (3)) ( <i>Liquide GI = Liquide Gastro-Intestinal</i> ) .....	17
Figure 3 :	Schématisation de la notion de bioaccessibilité .....	19
Figure 4 :	Schématisation des notions de biodisponibilité et bioaccessibilité.....	20
Figure 5 :	Intégration de la notion de bioaccessibilité et biodisponibilité par voie orale dans le processus d'absorption, distribution, métabolisation et excrétion (d'après Hosford (11)) .....	22
Figure 6 :	Absorption intestinale des contaminants apolaires, exemple du benzo(a)pyrène (extrait de Grøn <i>et al.</i> (12)).....	23
Figure 7 :	Processus influant sur le comportement et la migration des contaminants au niveau du sol ( <i>source : BRGM (37)</i> ) .....	37
Figure 8 :	Distribution des HAP dans les sols, exemple du benzo(a)pyrène (extrait de Grøn <i>et al.</i> (12)).....	38
Figure 9 :	Résultats de bioaccessibilité du plomb, de l'arsenic et du cadmium obtenus par la mise en œuvre de 5 essais <i>in vitro</i> (SBET, DIN, RIVM, SHIME et TIM) par Oomen <i>et al.</i> (51). ....	47
Figure 10 :	Représentation des segments du tractus digestif inclus dans chaque test de bioaccessibilité. ....	51
Figure 11 :	Représentation des durées des essais de bioaccessibilité comprenant les temps de résidence par segment et les durées déterminées des autres manipulations.....	51
Figure 12 :	Illustration des temps de résidence (en heures) des segments estomac et intestin grêle par test de bioaccessibilité par rapport aux références physiologiques. ....	52
Figure 13 :	Illustration des pH des segments estomac et intestin grêle par test de bioaccessibilité par rapport aux références physiologiques. ....	54
Figure 14 :	Illustration de résultats de bioaccessibilité dans les compartiments gastrique et intestinal de micropolluants inorganiques (d'après les résultats de Ellickson <i>et al.</i> (60), Roussel <i>et al.</i> (35), BARC (56) ). ....	55
Figure 15 :	Résultats des essais de bioaccessibilité du plomb dans le sol de référence NIST 2710 obtenus par la mise en œuvre de plusieurs essais <i>in vitro</i> par différents laboratoires – (BARC, 2011) (56). ....	56
Figure 16 :	Résultats des essais de bioaccessibilité de l'arsenic dans le sol de référence NIST 2710 obtenus par la mise en œuvre de plusieurs essais <i>in vitro</i> par différents laboratoires – (56). ....	57
Figure 17 :	Bioaccessibilité de PCB et HAP selon le test DIN en présence ou absence de mucines (61).....	60
Figure 18 :	Illustration de résultats de bioaccessibilité dans les compartiments gastrique et intestinal de micropolluants organiques : HAP (d'après les résultats de Lu <i>et al.</i> (40)). ....	61
Figure 19 :	Résultats de bioaccessibilité du plomb dans un sol selon 5 tests <i>in vitro</i> en présence et absence d'aliments (d'après Van de Wiele <i>et al.</i> (68)). ....	62
Figure 20 :	Résultats des essais de bioaccessibilité (dans la phase gastro-intestinale) de l'arsenic et du plomb dans le sol de référence NIST 2710 obtenus par la mise en œuvre de plusieurs essais <i>in vitro</i> par différents laboratoires – (BARC, 2011) (56). ....	63
Figure 21 :	Variation de la bioaccessibilité du diesel en fonction de la présence d'aliment (d'après Holman <i>et al.</i> (70)) .....	64
Figure 22 :	Résultats de bioaccessibilité du plomb de sols contaminés obtenus par la mise en œuvre du test RIVM en conditions à jeun ou avec introduction de deux types de nourriture (petit déjeuner ou spaghettis). ....	66

Figure 23 :	Bioaccessibilité du plomb dans un sol selon le test RIVM au cours duquel trois modes de traitement (centrifugation, filtration, ultrafiltration) des échantillons obtenus en fin de phase intestinale ont été mis en œuvre (D'après Van de Wiele <i>et al.</i> (68)).	69
Figure 24 :	Illustration des résultats de bioaccessibilités absolue (losanges bleus) et relative (carrés rouges) et de biodisponibilité relative (lignes horizontales roses et brunes) de l'arsenic (premier graphique) et du plomb (second graphique) dans le sol de référence NIST 2710 (56).	112
Figure 25 :	Logigramme de décision pour l'intégration de la bioaccessibilité dans les évaluations de risques sanitaires	120

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AOAC : Association Of Analytical Communities  
Pepsin Digestibility Test

As : arsenic

BA : bioaccessibilité

BaP : benzo[a]pyrène

BARC : Bioaccessibility Research Canada

BARGE : Bioaccessibility Research Group of  
Europ

BD : biodisponibilité

BGS : British Geological Survey

BM/RS : méthode du Bilan de Masse et de la  
Recapture du Sol

Cd : cadmium

CEC : capacité d'échange cationique

Cr : chrome

DJE : dose journalière d'exposition

EQRS : Evaluation quantitative des risques  
sanitaires

FAR : Fraction d'Absorption Relative

FOREhST : Fed Organic Estimation human  
Simulation Test

HAP : hydrocarbure aromatique polycyclique

IEUBK :

IEM : Interprétation de l'état des milieux

INERIS : Institut National de l'Environnement  
Industriel et des Risques

IVG: *In Vitro* Gastro-intestinal method

L : liquide

MO : matière organique

MS : matière sèche

NRC : National Research Council

Pb : plomb

PBDE : Polybromodiphényléther

PBET : Physiologically Based Extraction Test

PCB : Polychlorobiphényles

QD : Quotient de danger

RBALP : Relative bioavailability leaching  
procedure

RIVM : Institut National de Santé Publique et  
de l'Environnement, Hollande

S : solide

SBRC : Solubility/Bioavailability Resaerch  
Consortium

SHIME : Simulator of the Human Intestinal  
Microbial Ecosystem

TCLP : Toxicity Characteristic Leaching  
Procedure

TIM : TNO gastro intestinal model

UBM : Unified BARGE method

USEPA : United States Environmental  
Protection Agency

VTR : Valeur toxicologique de référence

Zn : zinc

# I. CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

Le retour d'expérience relatif aux évaluations de risque sanitaire sur les sites et sols pollués indique que la voie d'exposition par ingestion de sol est une des voies qui contribue majoritairement aux niveaux de risque, et dont les principales cibles sont les enfants.

Actuellement, les évaluations de risque considèrent, de façon sécuritaire, que la totalité d'une substance présente dans un sol ingérée par un individu, atteindra ses organes cibles et générera un effet toxique. Cependant, plusieurs études sur les animaux suggèrent que seule une fraction des substances présentes dans un sol parvient dans le sang, puis au niveau de l'organe cible. En effet, la matrice ingérée, qui véhicule la substance toxique, a une importance fondamentale dans la relation dose-effet de la substance étudiée. Il s'agit donc d'étudier le facteur correctif à mettre en œuvre dans le calcul de la dose d'exposition afin de tenir compte des variations de la relation dose-effet entre la matrice étudiée (sol) et la matrice de référence dont sont issues les valeurs toxicologiques de référence.

Ce facteur correctif se fonde sur deux éléments :

- la biodisponibilité orale, définie comme la fraction de la dose administrée parvenant dans le compartiment sanguin (1) ;
- la bioaccessibilité, définie comme la fraction de la dose administrée solubilisée dans le tractus gastro-intestinal et disponible à l'absorption (1).

Tandis que la biodisponibilité peut être évaluée par des tests *in vivo* sur les animaux (prélèvement et mesure dans le sang ou les organes d'animaux dont le système gastro-intestinal est similaire à celui de l'Homme), de nombreux tests *in vitro* simulant les conditions physiologiques du système digestif humain ont été développés en vue de mesurer la bioaccessibilité d'une substance, et ainsi, d'approcher sa biodisponibilité. Ces tests *in vitro* permettent donc, en théorie, d'estimer la quantité maximale de substance susceptible de passer dans le sang.

Ainsi, intégrer, sous forme d'un facteur correctif de la dose d'exposition, les notions de bioaccessibilité et/ou biodisponibilité dans les évaluations de risque permettrait d'étudier de façon plus pertinente le danger réel des substances présentes dans les sols d'anciens sites industriels, et ce, en vue d'ajuster les solutions de gestion envisagées.

C'est dans cet objectif qu'ICF Environnement et IPL SED Est ont réalisé cette étude globale ciblant les notions scientifiques de bioaccessibilité et/ou biodisponibilité des polluants dans le cas des sites et sol pollués.

La présente étude clarifie donc les notions de biodisponibilité et bioaccessibilité dans le cadre de l'ingestion de sol pollué par l'Homme. Un état des connaissances internationales est dressé en ce qui concerne l'utilisation actuelle de ces notions dans la gestion des sites et sols pollués : investigations à mener, analyse (caractéristiques des différents tests *in vitro* de bioaccessibilité, comparatif,...), résultats de bioaccessibilité, modélisation de la biodisponibilité, méthodologie pour l'intégration de ces notions dans les études à visée sanitaire. Enfin, un bilan est présenté afin de proposer une méthode d'intégration de ces paramètres dans les EQRS en France (en termes d'analyses et de méthodologie).

## II. METHODOLOGIE DE RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

Un fond documentaire préexistant du fait d'activités antérieures à ce projet sur cette thématique a constitué le premier élément de la bibliographie de ce rapport.

Une recherche a été initiée *via* la base de données bibliographiques « REFDOC » (INST<sup>1</sup>) et « MEDLINE » (NLM<sup>2</sup>), sur l'ensemble des catalogues mis à disposition. Les mots clés retenus pour cette recherche ont été :

- Bioavailability
- Bioaccessibility
- Health Risk Assessment

Une recherche parallèle a également été menée sur les sites internet des différents organismes nationaux et internationaux qui traitent de la problématique de l'évaluation de risque sanitaire de manière générale et de la bioaccessibilité en particulier (US-EPA, RIVM, Health Canada, BARGE<sup>3</sup>, BARC<sup>4</sup>, INERIS, ...), ainsi que sur des rapports universitaires (thèses).

Au total, un fond documentaire constitué de 250 publications a été recueilli et est présenté en ANNEXE 1.

## III. NOTIONS DE BIODISPONIBILITE ET BIOACCESSIBILITE : DEFINITIONS ET UTILISATIONS ACTUELLES

### III-1. Biodisponibilité et bioaccessibilité environnementale et toxicologique

#### III.1.1. Définitions générales

La biodisponibilité et la bioaccessibilité sont des notions qui ne sont pas définies de manière uniforme à travers les différentes publications (pour certains auteurs, les deux termes sont même parfois interchangeables (2)).

La biodisponibilité est spécifique d'un couple « cible/contaminant ». Elle est fonction de plusieurs paramètres tels que le temps d'exposition, le transfert du contaminant du sol vers les organismes, leur bioaccumulation, ainsi que leurs effets potentiels.

Dans ce chapitre, les notions de biodisponibilité et bioaccessibilité seront clarifiées selon les organismes cibles considérés (récepteur humain ou écologique). Dans cet objectif, et en vue d'assurer un cadre rigoureux à ces clarifications, les données suivantes sont extraites, entre autre, de la Norme Internationale EN ISO 17402 (2011) (3) relative à la sélection et l'application des méthodes d'évaluation de la biodisponibilité des contaminants dans le sol et matériaux du sol.

D'après la Norme ISO/TS 11074 (2005), et la Norme EN ISO 17402 (2011), la **biodisponibilité** est « *le degré auquel des substances chimiques présentes dans le sol peuvent être absorbées ou métabolisées par un récepteur humain ou écologique, ou être disponibles pour une interaction avec les systèmes biologiques* » (3). Le NRC (National Research Council) définit le « processus de biodisponibilité » comme étant l'ensemble des interactions physiques, chimiques et biologiques qui détermine l'exposition d'une plante ou d'un animal à un contaminant associé à des sols ou des sédiments (4).

---

<sup>1</sup> Centre National de la Recherche Scientifique, INstitut de l'Information Scientifique et Technique

<sup>2</sup> US National Library of Medicine, National Institutes of Health

<sup>3</sup> Bioaccessibility Research Group of Europe

<sup>4</sup> Bioaccessibility Research Canada

**La biodisponibilité** peut être interprétée comme un processus dynamique comprenant trois phases distinctes (Cf. Figure 1) :

- Etape 1 (disponibilité environnementale) : Disponibilité du contaminant dans les sols par des processus physico-chimiques de partition de la substance entre la phase solide et la phase liquide du sol. Selon la norme 17402 (2008), la disponibilité environnementale est « la fraction du contaminant potentiellement disponible pour des organismes et qui résulte des processus physico-chimiques de désorption » (3).  
La fraction disponible n'est pas fixe puisqu'elle est soumise aux conditions environnementales, de ce fait la répartition d'une substance dans l'environnement est la suivante :
  - « une fraction disponible réelle ou la quantité réelle dissoute [de polluant] dans des conditions ambiantes »,
  - « une fraction potentiellement disponible, c'est-à-dire la quantité maximale [de polluant] qui peut être libérée dans les conditions (prédéfinies) du cas le plus pessimiste, et »
  - « une fraction non disponible ».

La fraction potentiellement disponible ne peut pas être supérieure à la quantité totale présente dans le sol. De même, la fraction disponible réelle sera plus faible que la fraction potentiellement disponible.

- Etape 2 (biodisponibilité environnementale) : Absorption du contaminant par l'organisme, selon des critères physiologiques propres à l'espèce considérée (5). Selon la norme 17402 (2008), « la biodisponibilité environnementale est la fraction du composé disponible dans l'environnement qu'un organisme absorbe par des processus physiologiques » (3).
- Etape 3 (biodisponibilité toxicologique) : elle correspond à la distribution, l'accumulation et/ou l'effet (toxique) du contaminant dans l'organisme (6). Selon la norme 17402 (2008), « la biodisponibilité toxicologique est la concentration interne accumulée et/ou liée à un effet toxique. Cette définition se réfère aux concentrations internes chez les humains, les mammifères et autres organismes » (3). La description du processus de biodisponibilité toxicologique chez l'homme est approfondie et décrite au chapitre III-2.

La biodisponibilité dépend de variables telles que la nature du contaminant, les propriétés réelles du sol et la cible. Selon la norme ISO 17402 (3), il n'est pas possible de traiter de la biodisponibilité sans indiquer pour qui/quoi cette (bio)disponibilité est pertinente : biodisponibilité pour les organismes du sol ou biotopes, biodisponibilité pour les végétaux (ou phytodisponibilité), biodisponibilité chez les êtres humains (par ingestion, inhalation, et/ou contact dermique), biodisponibilité pour les organismes capables de transformer ou de minéraliser un contaminant, etc.

Il est donc important, dans une évaluation des risques associés à un sol contaminé, de bien définir la cible potentiellement exposée à cette contamination. Les cibles, ou objectif de protection, à retenir peuvent différer en fonction de l'usage actuel ou prévu du terrain étudié :

- |                             |                             |
|-----------------------------|-----------------------------|
| • êtres humains ;           | • végétation ;              |
| • animaux de pâturage ;     | • chaîne alimentaire ;      |
| • animaux sauvages ;        | • organismes aquatiques ;   |
| • invertébrés ;             | • eaux souterraines et eaux |
| • micro-organismes du sol ; | superficielles              |

En marge des évaluations de risque, il faut souligner que la (bio)disponibilité environnementale peut être utilisée pour estimer l'ampleur de la dégradation potentielle des contaminants organiques dans un procédé de réhabilitation par biodégradation ou par phytoremédiation. La (bio)disponibilité environnementale est alors utilisée pour prédire la capacité des micro-organismes à dégrader, ou la capacité d'une plante à absorber, les contaminants dans un sol (plus un contaminant est (bio)disponible dans l'environnement, plus le végétal ou le micro-organisme pourra l'utiliser, en l'absorbant ou en le dégradant).

D'un point de vue normatif, le terme de « **bioaccessibilité** » n'apparaît pas, en tant que tel, dans la norme EN ISO 17402 (3), plutôt orientée vers des problématiques générales englobant l'ensemble des récepteurs humains et écologiques. Le terme est toutefois évoqué et associé à la disponibilité environnementale comme énoncé par Semple *et al.* (7). En revanche, le terme de « **bioaccessibilité** » apparaît de façon précise dans la norme ISO/TS 17924 (8) où il est directement associé à l'organisme humain (norme relative à l'évaluation de l'exposition humaine par ingestion de sol et de matériaux du sol). Selon cette norme, « *la bioaccessibilité inclut tous les procédés physiques, chimiques et microbiologiques du corps humain, du broyage dans la bouche à la précipitation dans l'intestin* ».

Selon l'INERIS (9), la bioaccessibilité environnementale fait référence à la fraction d'une substance présente dans l'environnement et qui sera disponible, sur le long terme, pour une absorption par les organismes (récepteurs humains et écologiques). Cette fraction comprend la fraction disponible immédiatement et la fraction susceptible de devenir disponible dans le temps.

Dans sa définition la plus large, la bioaccessibilité est donc incluse dans la définition conceptuelle de la biodisponibilité pour l'Homme et les animaux supérieurs, telle que décrite dans la Figure 1.

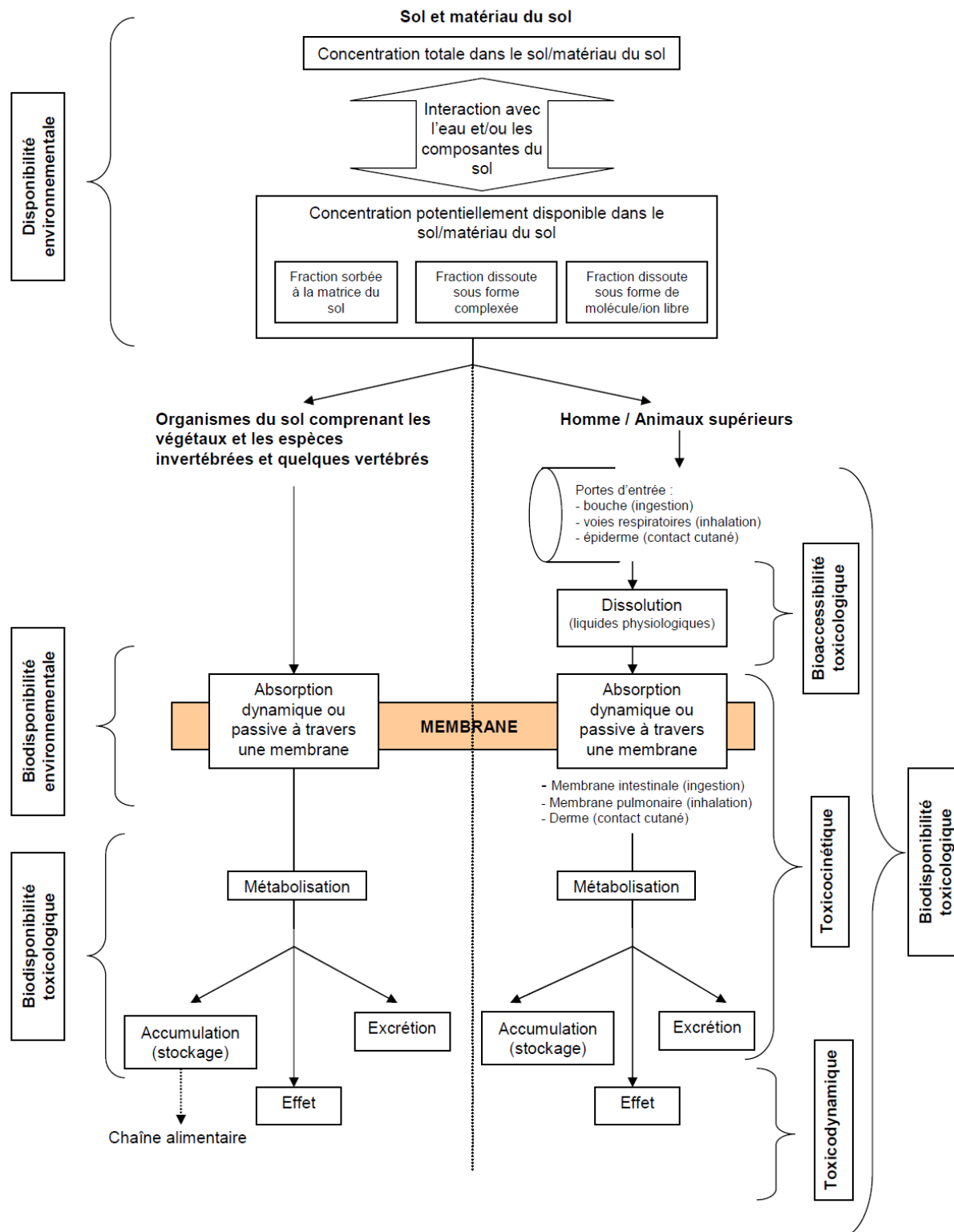


Figure 1 : De la concentration totale dans le sol à l'effet (modifié d'après la norme EN ISO 17402) (3)



### III.1.2. Méthodes de mesure de la biodisponibilité et bioaccessibilité d'un contaminant dans un sol

Selon la norme EN ISO 17402 (3), la biodisponibilité peut être évaluée selon deux manières complémentaires (Cf. Figure 2) :

- **les méthodes biologiques (*in vivo*)** qui ont pour objectif de détecter les effets liés à l'exposition des organismes vivants. La norme précise : « *en cas d'accumulation et/ou d'effets, des contaminants biodisponibles sont susceptibles d'être présents même s'ils ne peuvent être chimiquement identifiés [...]. Si cela n'est pas possible pour des raisons éthiques (s'agissant par exemple d'organismes supérieurs tels que les êtres humains) ou écologiques (par exemple si le nombre d'espèces dans l'écosystème à soumettre à essai est trop important), une solution peut être d'utiliser des organismes de substitution. Ils peuvent ensuite être utilisés comme indicateurs pour étudier les effets potentiels et/ou l'accumulation chez l'organisme à protéger ou sur les groupes fonctionnels ou l'écosystème total. Il convient de bien noter qu'en raison des variations intra- et inter-espèces, les résultats obtenus avec les organismes de substitution peuvent ne pas être extrapolés vers le récepteur spécifique à protéger* » ;
- **les méthodes chimiques (*in vitro*)** « *qui déterminent la fraction disponible d'une classe de contaminants bien définie pour des récepteurs biologiques spécifiques, ou leur mobilité dans le sol* ». Selon la norme EN ISO 17402, « *dans une évaluation de routine de la qualité des sols, il est possible de remplacer les essais biologiques par des mesurages chimiques si une corrélation a été démontrée entre les valeurs chimiques résultantes et l'effet ou l'accumulation [...]. Outre cette corrélation, il est nécessaire de comparer la précision, la sensibilité, ainsi que la durée et les coûts des essais chimiques et biologiques [...]. Des matériaux de référence ou des études de performance à des coûts raisonnables sont également nécessaires afin que des comparaisons des résultats des méthodes normalisées entre différents laboratoires puissent être effectuées* » (3).

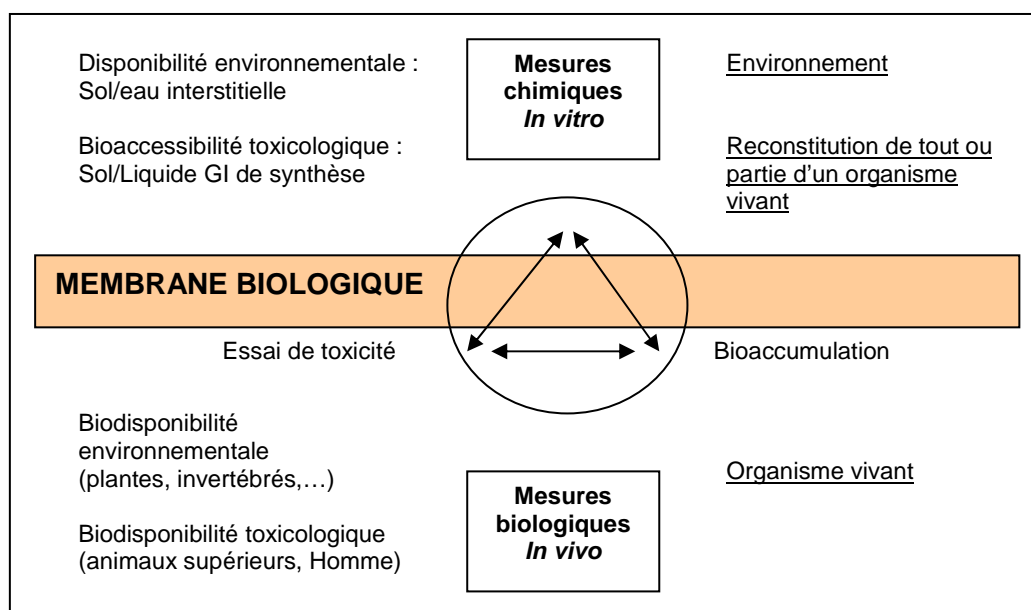


Figure 2 : Méthodes d'évaluation de la biodisponibilité (d'après la norme EN ISO 17402 (3)) (*Liquide GI = Liquide Gastro-Intestinal*)

Les méthodes chimiques (*in vitro*) permettent donc de mesurer les phénomènes s'opérant avant le passage de la membrane (disponibilité environnementale, bioaccessibilité toxicologique) et les méthodes biologiques (*in vivo*) permettent de mesurer les phénomènes s'opérant après le passage de celle-ci (biodisponibilité environnementale et biodisponibilité toxicologique).

## III-2. Exposition de l'Homme par ingestion de sol

**Dans la présente étude, l'objectif de protection (cible) est l'être humain. Seul le risque dû à l'exposition de l'Homme aux contaminants (métaux et composés organiques) présents dans une matrice « sol » est étudié. Il se limite donc au contact direct de la cible avec le sol<sup>5</sup>.**

L'exposition humaine à la contamination du sol est décrite dans les normes ISO/TS 15800 et ISO/TS 17924 (3). Elle peut se faire par le biais de différents milieux. Les voies d'exposition relatives à une exposition directe à partir du sol sont les suivantes :

- ingestion de sol, par voie alimentaire et par adhérence aux mains et aux légumes non lavés ;
- contact cutané ;
- ingestion et inhalation de poussières domestiques essentiellement composées de matériau de sol.

Les effets indirects, tels que l'exposition à un contaminant *via* la chaîne alimentaire (eau, viande, végétaux), font partie d'une procédure d'évaluation des risques sanitaires, mais la biodisponibilité des contaminants dans l'eau, la viande ou les végétaux consommés ne fait pas partie de l'objet du présent rapport.

**Dans cette étude, seule la voie d'exposition directe de l'Homme par ingestion de sol est prise en compte** (absorption directe de sol et/ou ingestion de poussières)<sup>6</sup>. Les comportements réels des cibles spécifiques au site doivent être étudiés (en se basant sur l'usage réel ou prévu du site). Les adultes ingèrent des poussières de sol lors de travaux extérieurs ou de la terre sur des végétaux non correctement lavés. Les enfants ont des comportements particuliers : ceux-ci peuvent ingérer des particules de sol de manière accidentelle (succion des doigts/mains/jouets souillés) ou de la terre proprement dite. Dans ce dernier cas, il peut s'agir d'une consommation intentionnelle à long terme (« comportement de Pica »). Le comportement de Pica est un cas très particulier qu'il convient de traiter à part et selon sa pertinence (1).

Dans cette étude de l'exposition de l'Homme par ingestion de sol, les notions de biodisponibilité et bioaccessibilité considérées sont les suivantes :

- disponibilité environnementale d'un contaminant dans un sol ;
- bioaccessibilité toxicologique d'un contaminant dans le tractus gastro-intestinal humain ;
- biodisponibilité toxicologique d'un contaminant dans l'organisme humain.

### III.2.1. Définitions de la biodisponibilité et bioaccessibilité toxicologiques

#### III.2.1.1 Bioaccessibilité et biodisponibilité absolues

##### *i) Bioaccessibilité absolue*

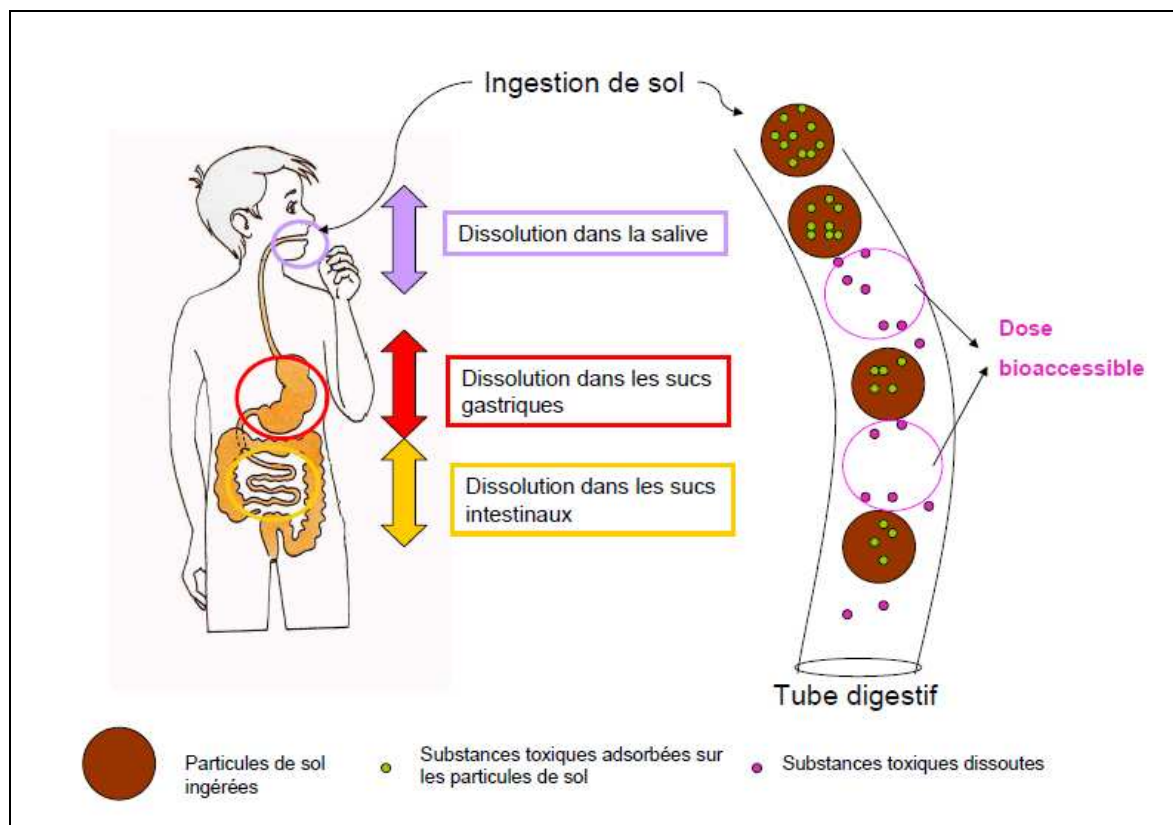
La fraction bioaccessible, ou bioaccessibilité orale d'un polluant présent dans une matrice (ex : nourriture, sol, eau etc.), est la fraction de ce polluant qui est extraite de cette matrice (mise en solution) par les fluides digestifs et par la salive, dans le tractus gastro-intestinal. La fraction bioaccessible peut se définir comme le ratio de la quantité extraite sur la quantité ingérée. N'étant pas déterminée par rapport à une référence, elle est appelée bioaccessibilité absolue (1).

$$\text{Bioaccessibilité absolue (\%)} = \frac{\text{quantité extraite de la matrice sol par les fluides digestifs}}{\text{quantité ingérée}} \times 100 \quad [\text{Équation 1}]$$

<sup>5</sup> A noter que cette étude ne prend pas en compte la toxicité d'un contaminant pur éventuellement présent dans les sols (phase pure souvent liquide, telle que huiles, goudrons, etc...).

<sup>6</sup> Les voies par contact cutané et par inhalation de poussières ne sont pas étudiées dans ce rapport.

L'intervalle des valeurs que peut prendre la bioaccessibilité absolue va de 0 à 100%. S'agissant d'une substance polluante présente dans un sol ingéré : quand la bioaccessibilité du polluant est égale à 0%, aucune molécule de polluant n'est dissoute dans les liquides biologiques (les substances restent adsorbées à leur support), quand elle prend la valeur de 100%, l'ensemble de la dose administrée est dissout dans les sucs digestifs (Cf. Figure 3).



**Figure 3 : Schématisation de la notion de bioaccessibilité**

**La fraction bioaccessible** est la dose maximale d'une substance ingérée disponible à l'absorption (fraction dissoute) et susceptible d'engendrer un effet toxique.

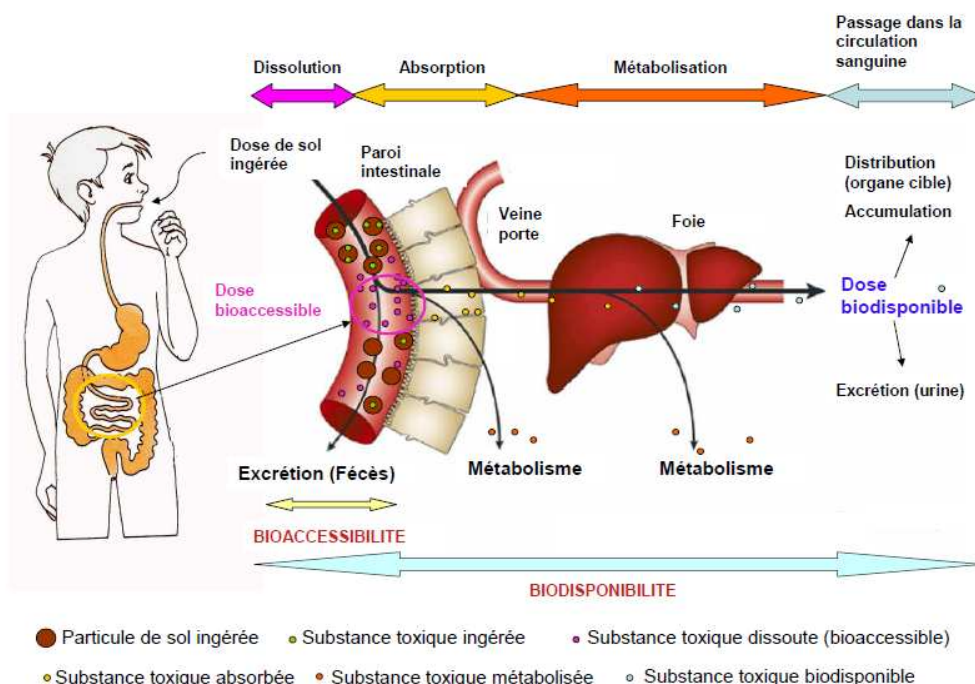
## ii) Biodisponibilité absolue

La fraction biodisponible, ou biodisponibilité orale d'un polluant présent dans une matrice (ex : nourriture, sol, eau etc.), est la fraction de ce polluant qui atteint la circulation sanguine (circulation systémique). La fraction biodisponible du polluant d'un sol peut donc se définir comme le ratio de la quantité ayant atteint la circulation sanguine sur la quantité ingérée. N'étant pas déterminée par rapport à une référence, elle est encore appelée biodisponibilité absolue (1).

$$\text{Biodisponibilité absolue (\%)} = \frac{\text{quantité ayant atteint la circulation sanguine}}{\text{quantité ingérée}} \times 100 \quad [\text{Équation 2}]$$

La biodisponibilité absolue peut théoriquement prendre, tout comme la bioaccessibilité absolue, des valeurs entre 0 et 100%. S'agissant d'une substance polluante présente dans un sol ingéré : quand la biodisponibilité du polluant est égale à 0%, aucune molécule de polluant n'atteint la circulation systémique (aucun effet toxique n'est attendu au niveau des organes cibles de la substance<sup>7</sup>), quand elle prend la valeur de 100%, l'ensemble de la dose administrée atteint la circulation systémique (effets toxiques attendus au niveau des organes cibles de la substance) (Cf. Figure 4).

**La biodisponibilité est donc l'élément clé de la relation « dose-effet » ou « dose-réponse » d'une substance.** Dans le contexte d'une évaluation des risques sanitaires, la valeur toxicologique de référence (VTR) utilisée dans les calculs pour une substance donnée est le reflet de la relation dose-réponse de cette substance. Cette relation dose-réponse a été estimée, le plus souvent de façon expérimentale, chez l'animal, grâce à une matrice de référence qui favorise l'obtention d'une biodisponibilité absolue maximale de la substance étudiée.



**Figure 4 : Schématisation des notions de biodisponibilité et bioaccessibilité**

<sup>7</sup> hormis un éventuel effet sur le système digestif par action directe du polluant sur les muqueuses gastro-intestinales (toxicité locale)

### *iii) Relation entre la biodisponibilité et la bioaccessibilité*

**La fraction biodisponible** représente la fraction de la dose administrée susceptible d'atteindre l'organe cible et donc d'exercer un effet toxique. Il convient de souligner cependant que seule la substance mère est prise en compte dans la notion de biodisponibilité, les métabolites (fraction de la substance ayant subi une métabolisation hépatique), qu'ils soient toxiques ou non, ne font pas partie de la fraction biodisponible (Cf. Figure 5).

La bioaccessibilité d'une substance dans l'organisme humain est donc une étape du processus complet de biodisponibilité (Cf. Figure 1 et Figure 4). La valeur de bioaccessibilité (quantité de substance dissoute dans le tractus gastro-intestinal) est donc, en toute logique, supérieure ou égale à la valeur de biodisponibilité d'une substance (quantité de substance qui atteint la circulation sanguine).

Au regard des définitions précédentes, il apparaît une relation entre la biodisponibilité et la bioaccessibilité (10). En effet, la biodisponibilité résulte de trois phénomènes successifs :

- la dissolution de la substance dans la salive, les sucs stomacaux et intestinaux (correspondant à la fraction bioaccessible),
- l'absorption à travers l'épithélium intestinal,
- la métabolisation hépatique.

Cette relation peut être décrite ainsi :

$$BD_i = BA_i \times AB_i \times M_i \quad \text{[Équation 3]}$$

Avec :  $BD_i$  : Fraction biodisponible de la substance i

$BA_i$  : Fraction bioaccessible (pour une substance i)

$AB_i$  : Fraction de la substance i absorbée à travers la paroi intestinale

$M_i$  : Fraction de la substance i non métabolisée

L'ensemble des processus d'absorption, distribution, métabolisation et excrétion constituant la biodisponibilité est schématisé dans la Figure 5.

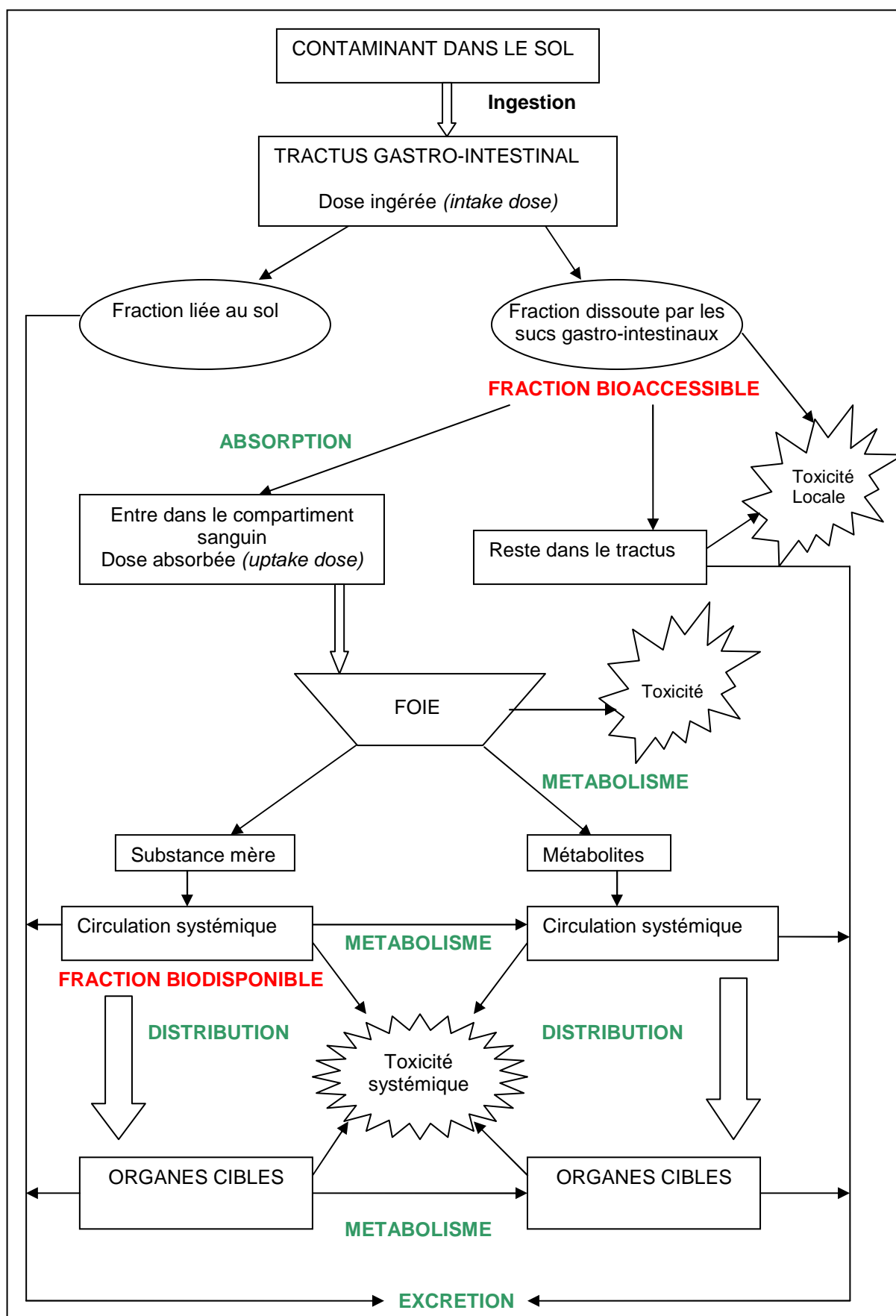


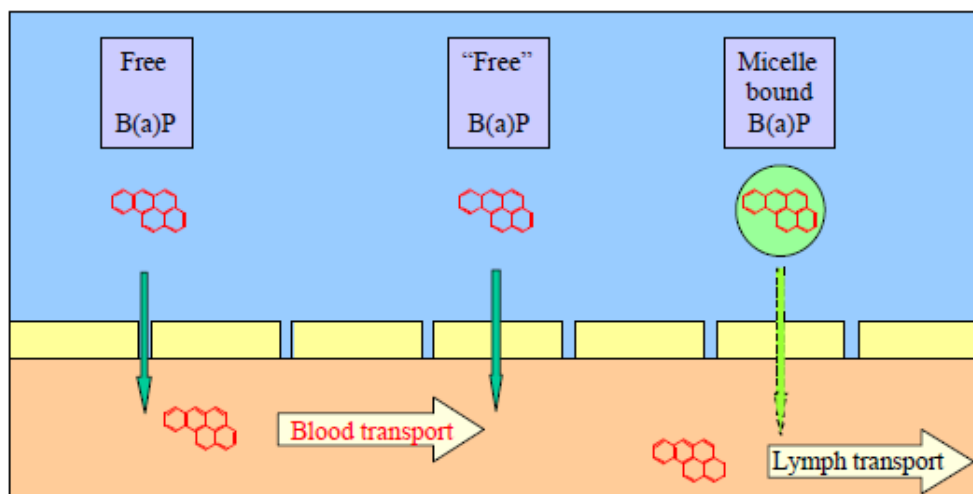
Figure 5 : Intégration de la notion de bioaccessibilité et biodisponibilité par voie orale dans le processus d'absorption, distribution, métabolisation et excrétion (d'après Hosford (11))

Concernant les processus physiologiques de dissolution (bioaccessibilité), absorption, métabolisation et excrétion, associés à la biodisponibilité toxicologique d'un contaminant, les éléments suivants peuvent être énoncés :

- Comme l'indique la norme ISO/TS 17924 (8), « l'absorption exige que les contaminants soient dissous (libres ou liés à un porteur dissous tel que la bile), transportés vers la paroi gastro-intestinale et, s'ils sont liés à un porteur, libérés à la surface de la paroi gastro-intestinale pour être absorbés. [...] Des acides biliaires, des protéines et autres agents complexants peuvent modifier la dissolution et l'absorption d'un contaminant. De plus, des lipides et autres matières organiques solubles présentes dans la ration alimentaire peuvent s'ajouter à l'effet porteur de la bile. Les processus simples de dissolution/transport/absorption peuvent être rendus plus complexes en raison de la cinétique chimique résultant du changement séquentiel de l'environnement chimique du tractus gastro-intestinal, ainsi que de la chimie du sol et du contaminant ».
- L'absorption de contaminants dissous se produit majoritairement à travers l'épithélium de l'estomac et de l'intestin grêle (épithélium intestinal), soit à travers les cellules (transport transcellulaire), soit entre les cellules (transport paracellulaire).

Le passage entre les cellules est le chemin principalement emprunté par les contaminants polaires ou ioniques, par exemple certains métaux, mais aussi pour certains composés apolaires, comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).

L'exemple des HAP est intéressant car il montre que la voie majoritaire d'adsorption peut être complétée par d'autres voies. Les HAP sont en effet absorbés par la membrane intestinale de 3 manières différentes : transport entre les cellules (préférentiel), transport par diffusion passive à travers les cellules, ces deux transports conduisent à une absorption dans la circulation sanguine. Dans le troisième cas (non clairement démontré pour les HAP), les composés seraient liés à des micelles, diffuseraient à travers les cellules mais seraient ensuite intégrés à la circulation lymphatique. Il n'a pas été démontré l'existence d'un transport actif transmembranaire pour les HAP (12).



**Figure 6 : Absorption intestinale des contaminants apolaires, exemple du benzo(a)pyrène (extrait de Grøn et al. (12))**

- Selon la norme ISO/TS 17924 (8), « le métabolisme des contaminants absorbés a lieu dans les membranes épithéliales (liaison et élimination) et dans le foie (transformation des métaux et sécrétion avec la bile). Les contaminants pénétrant dans la circulation générale par la voie lymphatique seront réduits de façon moins efficace car cette voie ne passe pas par le foie. Enfin, lorsque les contaminants pénètrent dans la circulation générale, ils sont dilués dans le flux sanguin ».

Pour la majorité des éléments métalliques, leur métabolisme dans le foie est faible (13). De ce fait, la fraction absorbée par l'épithélium intestinal est quasiment similaire à la fraction du composé qui atteint la circulation systémique (13). Pour les métaux, l'influence de la métabolisation hépatique sur la biodisponibilité absolue est donc jugée non significative. En revanche, on peut s'attendre à une plus ample métabolisation des composés organiques, et donc une influence plus significative de ce processus dans l'estimation de la biodisponibilité absolue des composés organiques (14).

- Une fois dans la circulation sanguine, les composés non métabolisés seront distribués, et éventuellement accumulés, dans les organes cibles afin d'exercer leur toxicité et/ou être excrétés. A noter que tous les métabolites ne sont pas nécessairement inactifs et excrétés, certains métabolites actifs pourront également exercer leur toxicité en passant dans la circulation systémique.

### III.2.1.2 Bioaccessibilité et Biodisponibilité relatives

La bioaccessibilité et biodisponibilité relatives ont pour objectif de comparer l'extraction d'une substance présente sous deux formes/spéciations chimiques différentes, ou celle d'une même substance sous la même forme dans deux matrices différentes (15)(16).

$$B \text{ relative} = B_a \text{ absolue} / B_b \text{ absolue}$$

Avec : B relative : Biodisponibilité/Bioaccessibilité relative (B étant homogène sur l'ensemble de l'équation, pas de croisement possible des deux termes)

$B_a$  : Biodisponibilité/Bioaccessibilité dans la matrice a / sous la spéciation a (matrice testée ou forme chimique testée)

$B_b$  : Biodisponibilité/Bioaccessibilité dans la matrice b / sous la spéciation b (matrice ou forme chimique de référence)

Alors que la valeur de la biodisponibilité/bioaccessibilité absolue est bornée entre 0 et 100%, la bioaccessibilité/biodisponibilité relative peut prendre une valeur supérieure à 1 dans le cas où la bioaccessibilité/biodisponibilité dans la matrice de référence « a » est supérieure à celle rencontrée dans la matrice étudiée « b ». Lorsque la bioaccessibilité/biodisponibilité relative est égale à 100%, cela signifie donc qu'elle est équivalente dans les deux conditions d'exposition (17).

A noter que la norme ISO/TS 17924 : 2008 désigne la mesure de la biodisponibilité relative comme la *Fraction d'Absorption Relative* (FAR).

Les principales études *in vivo* permettant l'évaluation de la biodisponibilité relative ont été développées aux Etats-Unis, et notamment sous l'influence de l'US-EPA (Cf. Tableau 1). Ces études révèlent que les valeurs de biodisponibilité relative sont très variables pour un même polluant entre les différents sites et sources de contamination, ainsi que pour les différents sols d'un même site, et mettent en évidence la diminution, et parfois l'augmentation (jusqu'à 116% pour le cadmium et 105% pour le plomb), de la biodisponibilité des métaux dans une matrice sol au regard des matrices de référence étudiées (18).



**Tableau 1: Principales études *in vivo* publiées déterminant la biodisponibilité relative des éléments traces métalliques dans les sols (extrait de la Thèse de J. Caboche (18))**

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

### III.2.2. Mesure de la biodisponibilité et bioaccessibilité toxicologiques

Malgré l'intérêt d'utiliser la biodisponibilité dans les études d'exposition, une limite importante pour son utilisation en routine provient de la nécessité d'avoir recours à des études *in vivo* qui sont longues, coûteuses, difficiles à mettre en œuvre et susceptibles de poser des problèmes éthiques.

Dans le cadre de l'évaluation de la biodisponibilité des métaux dans les sols au regard d'une matrice de référence, de nombreux auteurs indiquent que l'étape limitante de la biodisponibilité des métaux est la bioaccessibilité, suivie de l'absorption (12)(18). En effet, la bioaccessibilité (ou dissolution du contaminant) est extrêmement sensible aux changements de matrice (13)(18)(19), et l'absorption peut également être affectée par un tel changement (notamment *via* des phénomènes de compétition entre les substances en présence pour le transport à travers l'épithélium intestinal).

De ce fait, et considérant que la bioaccessibilité est l'étape limitante de la biodisponibilité des métaux, plusieurs groupes de recherche ont développé des tests de digestion *in vitro* permettant d'estimer la biodisponibilité orale (absolue) des contaminants métalliques du sol de manière simplifiée *via* la mesure de la bioaccessibilité (absolue), l'intérêt étant que ces essais sont moins onéreux et plus rapides (et éthiques) à réaliser que les tests *in vivo*.

En effet, les essais biologiques de biodisponibilité peuvent être remplacés par des mesures chimiques de bioaccessibilité s'il a été démontré qu'elles prédisent raisonnablement la biodisponibilité des contaminants définis pour l'organisme cible spécifique, dans des conditions de sol données (3)(8), c'est à dire s'il existe une corrélation linéaire suffisamment robuste permettant d'estimer la biodisponibilité (absolue) à partir d'une mesure de la bioaccessibilité (absolue) dans des solutions simulant les liquides biologiques.

Actuellement, la majorité des tests *in vitro* est basée sur l'hypothèse selon laquelle l'absorption n'est pas une étape limitante du processus de biodisponibilité. Ainsi, pour des composés dont l'absorption est l'étape limitante du processus de biodisponibilité (absorption trop lente pour être achevée avant le transit), les tests *in vitro* de mesure de la bioaccessibilité (absolue) ne permettront pas d'approcher de façon pertinente la biodisponibilité (absolue) du composé.

En outre, et malgré une corrélation linéaire possible entre biodisponibilité et bioaccessibilité, les tests *in vitro* ne considèrent que l'environnement biochimique, sans tenir compte des effets des mécanismes de transport actif et du rôle des micro-organismes du tractus gastro-intestinal. La majorité des tests de bioaccessibilité ne simule pas le passage dans le colon. Or, les conditions physico-chimiques et microbiennes très spécifiques du colon pourraient impacter les particules de sols et faciliter la mobilisation de certains métaux. Par ailleurs, les essais biologiques restent particulièrement utiles dans les situations de mélanges complexes de contaminants pouvant être présents dans les sols contaminés (3)(8).

Deux types de méthodes chimiques de mesure de bioaccessibilité sont décrites dans la norme EN ISO 17402 (3) :

- procédés d'extraction basés sur la physiologie et mimant les conditions physico-chimiques de l'estomac et de l'intestin (testés pour le plomb, le cadmium, le zinc, le nickel, le mercure, les PCB, et les HAP) ;
- procédés d'extraction acide (uniquement testés pour le plomb).

La norme ISO 17924 (8), spécifique à l'évaluation de l'exposition humaine par ingestion de sol, privilégie les tests de simulation de la digestion incluant une étape gastrique et une étape intestinale. Cette norme ne fait donc pas référence aux tests d'extraction acide « simples ».

En ce qui concerne les procédés de mesure de la bioaccessibilité, différentes catégories existent et peuvent varier en fonction des auteurs. Dans ce rapport, nous distinguerons les trois catégories suivantes : les tests chimiques simples, les tests physiologiques simples et les tests physiologiques avec analogues gastro-intestinaux.

- **Les tests chimiques simples** (susceptibles d'intégrer les procédés d'extraction acide décrits dans la norme EN ISO 17402) sont constitués d'une seule phase (la phase gastrique) et les protocoles n'utilisent que des réactifs chimiques inorganiques (acide chlorhydrique) sans aucune mise en condition physiologique (pas de température à 37°C) : test TCLP modifié de SGS (Toxicity Characteristic Leaching Procedure) ;
- **Les tests physiologiques simples** (susceptibles d'intégrer les procédés d'extraction acides décrits dans la norme EN ISO 17402) sont constitués d'une seule phase (généralement la phase gastrique), les protocoles utilisent peu de réactifs chimiques (glycine, phosphates, HCl) mais une mise en condition physiologique est réalisée (température à 37°C). Les méthodes correspondantes sont : RBALP<sup>8</sup> (Relative Bioaccessibility Leaching procedure) ou SBET (Simplified Bioaccessibility Extraction test), test avec phosphate (Exponent), test avec glycine (Exponent), test avec HCl de Santé Canada.
- **Les tests physiologiques avec analogues gastro-intestinaux**, à l'inverse, sont constitués de plusieurs phases (salivaire, gastrique et/ou intestinale) et nécessitent un plus grand nombre de réactifs mais surtout des réactifs complexes correspondant à des analogues intestinaux (enzymes, sels biliaires). Les tests de cette catégorie sont : PBET (Physiologically Based Extraction Test), IVG (*In vitro* gastro-intestinal method), le test du RIVM, SHIME (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem), UBM (Unified BARGE Bioaccessibility Method), DIN (norme allemande), TIM (TNO gastrointestinal model), AOAC (Association Of Analytical Communities Pepsin Digestibility Test), US Pharmacopeia model, MB&SR method (Mass balance & Soil Recapture).

Ces méthodes de mesure de la bioaccessibilité sont décrites dans le chapitre IV-2 (Analyse).

Par ailleurs, il faut souligner l'existence d'**extractions chimiques séquentielles** permettant, sur la base des caractéristiques physico-chimiques spécifiques d'une substance et d'un type de sol associé, d'estimer l'ensemble des paramètres qui sous-tendent la disponibilité environnementale de cette substance dans le sol étudié, puis par modélisation, d'estimer la bioaccessibilité toxicologique de cette substance. Cette méthode sera décrite dans le chapitre IV-3 (Résultats et Modélisation)

---

<sup>8</sup> Il semblerait que le test RBALP soit similaire au test mis au point par le SBRC (Solubility/Bioavailability Research Consortium). Les dénominations RBALP, SBET et SBRC semblent donc correspondre au même essai.

### III-3. Utilisations actuelles de ces notions

#### III.3.1. Les différents types d'études d'exposition

On peut citer à titre d'exemple, quatre cadres d'utilisation et d'application potentielles de la bioaccessibilité (1) :

- Dans le cadre de l'**Interprétation de l'Etat des Milieux (IEM)**, tel que défini par la circulaire du 8 février 2007, rappelons que le critère décisionnel concernant la voie ingestion de terre se fonde, entre autre, sur une comparaison à un environnement témoin. Il s'agit de comparer les concentrations des sols sur le site étudié aux concentrations mesurées dans les sols de l'environnement témoin. Dans ce cas, l'intégration des notions de biodisponibilité/bioaccessibilité n'est pas nécessaire, à moins de l'absence de référentiel témoin ou de valeurs réglementaires nécessitant un calcul de risque (« grille IEM » dont la démarche s'apparente à celle de l'évaluation quantitative des risques sanitaires (EQRS)). En revanche, il serait utile d'intégrer la spéciation de l'élément dans la comparaison du sol étudié au sol témoin, et ceci afin, d'une part, de tenir compte des spécificités de l'espèce en présence en terme de toxicité potentielle, et d'autre part, afin d'apporter ainsi une connaissance supplémentaire concernant l'origine de la source de pollution étudiée (naturelle/anthropique).
- Dans le cadre des **études d'exposition**, la valeur de la bioaccessibilité peut être utilisée pour affiner la mesure de l'exposition à un polluant présent dans un sol. Une étude d'exposition permet de déterminer les niveaux d'exposition de la population à partir des résultats des études environnementales (dose externe d'exposition de la population). Dans ce cas, l'intégration des notions de biodisponibilité et bioaccessibilité peut être envisagée. Les études d'exposition se basant sur une évaluation de la contamination de la population en dose externe constituent la deuxième étape de la démarche d'EQRS (« Evaluation de l'Exposition »). L'étude d'exposition peut parfois être complétée par des dosages de biomarqueurs de contamination dans la population exposée (dose interne ou dose réellement absorbée). Dans ce cas, l'intégration des notions de bioaccessibilité et biodisponibilité est inutile car le biomarqueur ou bioindicateur reflète, par lui-même, la réponse biologique à une exposition.  
  
Les doses d'exposition estimées sont ensuite comparées à des valeurs normatives, valeurs guides, ou valeurs témoins. S'il s'agit d'une comparaison de dose d'exposition à une valeur observée dans une population témoin, la bioaccessibilité/biodisponibilité devra être étudiée dans les deux populations. S'il s'agit d'une comparaison de dose d'exposition à une valeur toxicologique de référence bibliographique, cette démarche s'apparente à celle d'une EQRS.
- Dans le cadre de l'**étude d'impact**, l'état initial de l'environnement devrait également, en plus des concentrations totales, proposer d'intégrer les différences liées à la spéciation des substances identifiées comme traceur, à l'image de l'IEM. Cette connaissance approfondie permettrait de mieux interpréter la part attribuable à l'installation en activité. Concernant le **volet sanitaire de l'étude d'impact**, et l'estimation des doses d'exposition des populations riveraines de l'installation, cette démarche s'apparente à l'étude d'exposition, avec une comparaison entre un état initial et l'état final. Ainsi, intégrer dans le volet sanitaire de l'étude d'impact, pour l'état initial et l'état final, les notions de bioaccessibilité/biodisponibilité, peut permettre d'affiner l'interprétation de l'impact sanitaire associé à l'activité de l'installation (risque sanitaire attribuable à l'installation).
- Dans les **Evaluations Quantitative des Risques Sanitaires** : plusieurs critères ont été mis en avant pour déterminer la pertinence d'intégrer la notion de biodisponibilité et/ou de bioaccessibilité dans les évaluations de risques sanitaires. Il faut notamment que l'ingestion de sol soit une voie prépondérante du risque, que la valeur de biodisponibilité du contaminant sous sa forme rencontrée sur le site soit supposée inférieure à la valeur par défaut et que par conséquent l'utilisation d'une biodisponibilité spécifique au site aura une conséquence importante sur les réhabilitations envisagées (diminutions des coûts et des moyens mis en œuvre notamment dans le cas de site de taille importante) (16)(20)(21). La décision doit tenir compte également du coût (16)(20)(21)(22)(23)(24) et du temps nécessaire (24) à l'obtention

des données par rapport aux coûts de réhabilitation *a priori*, et des délais imposés pour l'étude de risque.

**En résumé, les notions de biodisponibilité/bioaccessibilité toxicologiques visent des études relative à la santé humaine** dont l'objectif est la détermination d'une dose d'exposition pour une cible humaine, pour une ou plusieurs substances chimiques, à comparer à une dose d'exposition de référence (étude d'exposition, grille de calcul « IEM », EQRS, volet sanitaire d'étude d'impact). L'intégration de ces notions doit toutefois se faire de façon rigoureuse, c'est-à-dire de façon conjointe dans l'estimation de la dose d'exposition de la cible étudiée et celle de la dose d'exposition de référence.

**Les notions de biodisponibilité/bioaccessibilité toxicologiques sont inutiles lorsque l'étude a pour objectif d'étudier la concentration d'une substance dans l'environnement**, par comparaison entre un état initial et un état final (étude d'impact), ou entre un environnement d'étude et un environnement témoin (IEM). Dans ces cas, l'intégration de la **spéciation (étudiée par exemple via des extractions séquentielles)** des substances identifiées comme traceur suffit et permettrait de mieux interpréter la part attribuable à la source de pollution étudiée.

### III.3.2. Evaluation Quantitative des Risques Sanitaires par ingestion de sol

La démarche d'évaluation des risques a été développée par l'académie américaine des sciences au début des années 1980 ; elle a ensuite été reprise par l'Union Européenne. Selon cette démarche, l'évaluation des risques liés aux substances chimiques se décompose en quatre étapes :

- **la caractérisation du contexte environnemental du site** (sources potentielles de contamination, vecteurs de transfert, récepteurs) ;
- **l'évaluation de l'exposition** consiste à quantifier l'intensité, la fréquence et la durée de l'exposition des populations (les concentrations ou les doses journalières d'exposition) sur la base du schéma conceptuel d'exposition établi, récapitulant l'ensemble des voies de transfert et d'exposition pour les populations cibles ;
- **l'évaluation de la toxicité** englobe l'identification du potentiel dangereux (ou détermination des effets indésirables que les substances chimiques sont intrinsèquement capables de provoquer chez l'homme) et l'évaluation des relations dose-effet (ou estimation du rapport entre le niveau d'exposition, ou la dose, et l'incidence et la gravité des effets) ;
- **la caractérisation du risque** est la synthèse de l'évaluation des risques, et quantifie le risque lié aux substances chimiques, en présentant les résultats sous une forme exploitable, accompagnée d'une évaluation des incertitudes relevées tout au long de l'étude.

L'intégration des notions de biodisponibilité et de bioaccessibilité interviendrait au niveau de l'évaluation de l'exposition, *via* le calcul de la dose journalière d'exposition. La dose Journalière d'exposition (DJE<sub>i</sub>) pour l'ingestion d'une substance *i* contenu dans les sols est égale à :

$$DJE_i = \frac{C_{i_{sol}} \times Fb_i \times TI \times EF \times ED}{BW \times AT} \quad [\text{Équation 4}]$$

Avec :

DJE <sub>i</sub>	=	Dose journalière d'exposition à la substance <i>i</i> (mg/kg/j)
C <sub>i<sub>sol</sub></sub>	=	Concentration de la substance <i>i</i> dans le sol (mg/kg)
Fb <sub>i</sub>	=	Fraction biodisponible de la substance <i>i</i> dans le sol étudié (-) = 100% (à titre de précaution)
TI	=	Taux d'ingestion de sol (kg/jour)
EF	=	Fréquence d'exposition (jours/an)
ED	=	Durée d'exposition (années)
BW	=	Poids corporel (kg)
AT	=	Temps moyenné (période sur laquelle l'exposition est moyennée - jours)

En France, actuellement, la biodisponibilité de la substance i dans les sols étudiés est le plus souvent considérée égale à 100%, par précaution. Cela implique que le calcul des doses d'exposition ne tient compte que de la concentration totale de la substance dans les sols, sans tenir compte ni de sa disponibilité environnementale ni de sa bioaccessibilité/biodisponibilité toxicologique.

Au-delà de la biodisponibilité toxicologique d'une substance, un autre facteur d'exposition apparaît comme un paramètre sensible dans l'estimation de la DJE : le taux d'ingestion de sol. Il est donc abordé ci-dessous à titre d'information et en complément de l'exploitation qui peut être faite de la biodisponibilité/bioaccessibilité :

- Pour l'enfant, la valeur usuelle de 100, voire 150 mg de sol ingéré par jour est généralement considérée dans les études d'estimation de l'exposition ou d'évaluation quantitative du risque sanitaire réalisées en France. D'autres valeurs plus élevées ou plus faibles sont cependant observées dans la littérature (de 20 à 200 mg/j) (1). En 2000, Stanek (cité dans « Ingestion de sol : état des connaissances et propositions » (1)) proposait de retenir, pour l'enfant, une valeur haute de 100 mg/j (percentile 95) et une valeur médiane de 20 mg/j. En 2003, l'US-EPA suggérait un taux d'ingestion moyen de 100 mg/j chez l'enfant de 1 à 6 ans<sup>9</sup>. Puis, en 2008, l'US-EPA a proposé un taux d'ingestion de sol de 50 mg/j, et un taux d'ingestion de sol et poussières de 100 mg/j (valeurs médianes)<sup>10</sup> (25). Plus récemment, concernant la quantité de sol ingéré par un enfant (non pica), l'INERIS et l'INVS privilégient la distribution proposée par Stanek au sein de laquelle la médiane à 24 mg/j et le percentile 95 à 91 mg/j (arrondi à 100 mg/j dans les recommandations du groupe de travail) sont plus particulièrement visés (1). Le groupe de travail met toutefois en avant l'intérêt de considérer une distribution de la quantité de sol ingéré dans une population d'enfants afin de pouvoir appréhender, lorsque cela s'avère nécessaire, l'incertitude au sein de cette population à travers l'utilisation des approches probabiliste et possibiliste (1).
- Pour l'adulte, l'US-EPA distingue plusieurs scénarios d'exposition en fonction de l'activité exercée. En 2002, un taux d'ingestion de sol de 100 mg/j était proposé pour un adulte résidant et un travailleur à l'extérieur ; un taux de 50 mg/j était proposé pour un travailleur à l'intérieur, et un taux de 300 mg/j était proposé pour un ouvrier de chantier. En 1997, Stanek proposait de retenir, chez l'adulte, une valeur haute de 50 mg/j (percentile 75) et une valeur médiane de 10 mg/j (sans précision relative au type d'activité) (1).

**L'intégration des notions de biodisponibilité et bioaccessibilité est destinée à effectuer une évaluation du risque plus réaliste et spécifique au site. Dans le contexte d'une évaluation des risques sanitaires associés à l'ingestion de sol, il s'agit donc d'étudier « l'effet matrice » sur la relation dose-effet utilisée en référence pour le calcul de risque sanitaire (VTR). Considérant, d'une part, que l'effet à étudier est celui du changement de matrice, et d'autre part, que la relation à étudier est la relation dose-effet, la biodisponibilité relative apparaît donc comme le seul facteur correctif qui permette d'ajuster de façon pertinente et rigoureuse le calcul de la dose d'exposition (Cf. chapitre III.2.1).**

L'utilisation actuelle, européenne et internationale, des notions de bioaccessibilité et biodisponibilité dans les EQRS est présentée dans le chapitre suivant. L'ensemble des méthodologies publiées dans la littérature et ayant intégré les notions de bioaccessibilité et biodisponibilité dans une étude de risque sera décrit dans le chapitre IV-4 (« Etude »).

<sup>9</sup> US-EPA, Child-Specific Exposure Factor Handbook (Interim report), 2003.

<sup>10</sup> US-EPA, Child-Specific Exposure Factor Handbook, 2008.

### III.3.3. Point sur l'intégration de ces notions dans les études sanitaires

#### III.3.3.1 Au niveau international :

**Au moins deux normes (mentionnées précédemment) s'appuient sur les notions de biodisponibilité et/ou de bioaccessibilité concernant soit l'évaluation des risques soit l'évaluation de l'exposition. Le domaine d'application de ces deux référentiels apparaît relativement différent.**

- Le texte de la norme EN ISO 17402 : 2011 (3) a été élaboré par le Comité Technique ISO/TC 190 « Qualité du sol » de l'Organisation Internationale de Normalisation (ISO). Ce guide donne des lignes directrices pour la sélection et l'application des méthodes permettant d'évaluer la biodisponibilité pour la caractérisation du sol et des matériaux du sol contaminés. Il spécifie les principes et les conditions limites des méthodes à utiliser et indique les exigences minimales relatives au développement de méthodes. Ce guide précise que les résultats peuvent être utilisés en tant qu'estimation de la biodisponibilité dans une approche d'évaluation de risque ;
- Le texte de l'ISO/TS 17924 (8) : 2008 publié par l'AFNOR en mars 2008, donne des lignes directrices à utiliser lors du choix d'une procédure d'essai pertinente pour l'estimation de la bioaccessibilité/biodisponibilité pour l'homme de métaux dans un sol contaminé, en liaison avec l'évaluation de l'exposition liée à l'absorption orale par l'homme.

#### III.3.3.2 Etats-Unis :

L'US EPA étudie, depuis 1989, dans le « Risk Assessment Guidance for Superfund Volume 1 Human Health Evaluation Manual part A », la possibilité d'introduire la biodisponibilité dans les calculs de risque mais sous les termes « d'absorption relative » (ANNEXE A, ajustement concernant l'absorption). Cette annexe souligne qu'il existe une différence d'absorption selon la matrice dans laquelle se trouve la substance et qu'il est donc préférable d'utiliser un facteur correctif, cependant en l'absence de données valides, la valeur de l'absorption relative devra être fixée à 1 (RAGS part A, ANNEXE A). En pratique, en 2003, sur les 10 régions affiliées à l'US EPA, 7 n'ont pas de lignes directrices pour l'incorporation de la biodisponibilité dans les études d'exposition ou les évaluations de risque, une seule dispose de lignes directrices limitées et deux autres autorisent officiellement un ajustement des niveaux de dépollution basé sur la biodisponibilité. Il est à noter cependant que 4 ou 5 régions ont déjà accepté ponctuellement ce type de réajustement et qu'une seule l'a totalement rejeté (12).

Le plomb est le composé qui semble susciter le plus d'intérêt : plusieurs éléments permettant la prise en compte de sa biodisponibilité et de sa bioaccessibilité sont ainsi disponibles. Ainsi, pour le plomb, il a été introduit la notion de biodisponibilité relative entre la consommation de nourriture/boisson et l'ingestion de sol et poussières, grâce au modèle IEUBK. Ce modèle donne une biodisponibilité dans l'eau ou les aliments de 50% et dans les sols de 30%, soit une biodisponibilité relative de 60%. Les données sont issues de test *in vivo* réalisés sur le porc juvénile, jusqu'alors le seul test accepté par l'US EPA pour la mesure de la biodisponibilité (15)(16).

Dès 2007, l'US EPA a reconnu, sur le plan national, l'intérêt de l'utilisation de la bioaccessibilité, uniquement pour le plomb, en alternative des tests *in vivo* (15)(16). Une étude a également permis d'évaluer de façon semi-quantitative la biodisponibilité relative au plomb en fonction de la spéciation minéralogique des particules (26). Les auteurs précisent que ces résultats ne peuvent être utilisés pour prédire une valeur quantitative de biodisponibilité relative au plomb dans un sol, mais qu'ils peuvent être utilisés dans les évaluations de risque en prenant en compte leur caractère incertain. Une étude similaire a été menée avec l'arsenic (27).

En 2008, l'US EPA a publié un document de référence: "Standard Operating Procedure for an *in vitro* bioaccessibility assay for lead in soil" qui fournit une méthodologie pour évaluer la bioaccessibilité du plomb dans des échantillons de sol (28). L'US-EPA est la seule agence gouvernementale ayant officiellement validé un test *in vitro* pour le plomb. La méthodologie est fondée sur la démonstration d'une corrélation entre les études *in vitro* et *in vivo* pour 19 sols contaminés par le plomb. Aucune autre étude n'a permis de valider à ce jour l'emploi de cet essai pour d'autres contaminants, malgré des recherches considérables focalisées sur l'arsenic et les HAP (4).

### III.3.3.3 Australie :

En Australie, les mesures *in vitro* et *in vivo* ne sont pas pleinement reconnues, malgré d'importantes recherches sur la validation des tests *in vitro* (4). Ainsi, les notions de biodisponibilité et bioaccessibilité semblent importantes dans les processus d'évaluation des risques, mais il reste des réticences pour utiliser ces notions dans les lignes directrices. Ceci est principalement dû à l'absence de validation et de standardisation des méthodes existant actuellement (4). Il en résulte que le National Environment Protection Council préconise l'utilisation d'une valeur de biodisponibilité par défaut de 100%.

Néanmoins, il peut être observé que deux tests physiologiques *in vitro* semblent être utilisés pour évaluer la bioaccessibilité de l'arsenic et du plomb (29). Il faut noter que ces deux tests ne simulent que la phase gastrique de la digestion (Cf. chapitre IV-2).

### III.3.3.4 Canada :

Les lignes directrices et les documents officiels pour la réhabilitation des sites et sols pollués sont basés sur la quantité totale dans les différentes matrices (sol, sédiments et eau). Cependant le réseau de recherche Bioaccessibility Research Canada (BARC) travaille, en parallèle du groupe BARGE (BioAccessability Research Group in Europe), sur la prise en compte de la bioaccessibilité dans les évaluations de risque sanitaire et son acceptabilité par les autorités compétentes (30).

Dans le « Part I : Guidance on Human Health Preliminary Quantitative Risk Assessment (PQRA) » de Santé Canada, il est indiqué que, par voie orale, l'absorption relative doit toujours être supposée égale à 100% (RAF=1), du fait de données limitées sur la biodisponibilité des contaminants et pour une approche plus sécuritaire (31). Le document « Part III: Guidance on Peer Review of Human Health Risk Assessment » indique toutefois que la biodisponibilité peut être mesurée à partir de test *in vitro* de bioaccessibilité et si une valeur de biodisponibilité orale inférieure à 100% doit être utilisée, elle doit être basée sur une mesure de bioaccessibilité spécifique au site (31). Le guide n'indique cependant aucune méthodologie d'intégration de cette valeur dans le calcul de risque (31).

Seul l'Ontario traite de la biodisponibilité au regard des juridictions par province. Dans le « Guidance on site specific risk assessment for use at contaminated sites in Ontario », il est ainsi indiqué que les valeurs de biodisponibilité doivent être obtenues uniquement à partir de données sur l'Homme ou l'animal (31).

### III.3.3.5 Europe :

Actuellement, au sein de l'Europe, le groupe de recherche BARGE (BioAccessability Research Group in Europe) qui fédère plusieurs laboratoires et instituts de recherche, tente de développer un test unique, répétable et reproductible de mesure de la fraction bioaccessible : le test UBM (Unified BARGE Method), fondé sur le protocole expérimental du test du RIVM.

#### i) Royaume-Uni :

La biodisponibilité orale est considérée comme un facteur important dans l'estimation de l'exposition humaine aux polluants de l'environnement par l'agence de l'environnement et le DEFRA<sup>11</sup>. L'utilisation de la bioaccessibilité pour approcher la valeur de biodisponibilité n'est cependant pas encore tout à fait acceptée (15)(16), comme le montre les préconisations disponibles depuis 2009 dans le guide « Human health toxicological assessment of contaminants in soil ». Dans ce document, l'utilité de la notion de bioaccessibilité apparaît mais en soulignant toutefois le besoin de validation des méthodes *in vitro* (précision et reproductibilité) (11).

---

<sup>11</sup> DEFRA : Department for Environment Food and Rural Affairs

En pratique, les autorités locales ont connaissance de la notion de bioaccessibilité et l'utilisent parfois. Un questionnaire a été envoyé aux autorités locales d'Angleterre et du Pays de Galles avec plusieurs objectifs :

- identifier le degré d'utilisation de la bioaccessibilité au niveau local,
- identifier les contraintes d'utilisation ainsi que le rôle actuel et potentiel de la bioaccessibilité dans le management des sites contaminés,
- identifier les manques de données à combler (22).

Les réponses indiquent que la bioaccessibilité est un outil utile pour le management des sols pollués, mais mettent aussi en avant un besoin d'information supplémentaire. Les principaux problèmes soulevés pour l'utilisation de la bioaccessibilité dans les EQRS sont la variabilité des résultats entre les laboratoires pour un même échantillon, le manque de méthode de mesure standard, l'absence de validation des méthodes *in vitro* par des méthodes *in vivo* et l'inexistence de lignes directrices méthodologiques pour définir clairement et homogénéiser l'intégration de cette notion dans les évaluations de risque sanitaire.

Un document de l'Environment Agency de 2007 ainsi que la note pratique du Chartered Institute of Environmental Health de 2009 reprennent globalement les mêmes conclusions (32)(33).

La note pratique du Chartered Institute of Environmental Health conclut que la bioaccessibilité n'est pas toujours utilisée de manière adéquate dans les évaluations quantitatives des risques sanitaires (33). Cette note souligne par ailleurs que, malgré une utilisation avérée de la bioaccessibilité au plan local par les évaluateurs de risque anglo-saxons, l'Agence de l'Environnement britannique paraît rejeter son application, ce qui conduit alors à une approche parfois trop conservatrice de l'évaluation de risque.

#### ii) Allemagne :

Une norme a été préparée par le comité allemand de normalisation pour l'eau. La norme DIN 19738 (2004) pour la qualité des sols et la bioaccessibilité des polluants organiques et inorganiques dans les sols contaminés donne un protocole expérimental pour mesurer la bioaccessibilité de composés organiques et inorganiques. En revanche, aucune information n'apparaît sur la méthodologie d'intégration de ces mesures dans les évaluations de risque sanitaire.

#### iii) Danemark :

L'agence de l'environnement danoise a mandaté le bureau d'étude DHI Water and Environment en 2005 afin d'examiner la possibilité et la pertinence d'utiliser la bioaccessibilité dans les évaluations de risques sanitaires. DHI Water and Environment a alors recommandé l'utilisation de la bioaccessibilité pour le plomb et le cadmium mais après validation des tests *in vitro* par des tests *in vivo* (15)(16).

Dans un document du RIVM (30), il est indiqué que l'Agence de l'Environnement danoise autorise l'utilisation de la bioaccessibilité pour le plomb et le cadmium dont les valeurs auront été obtenues par le test uniformisé du groupe BARGE en condition à jeun.

Néanmoins, en pratique, il semble que la notion de bioaccessibilité soit peu utilisée dans les évaluations de risque. En effet, une recherche sur le site internet de l'Agence de l'Environnement danoise n'a pas permis de mettre en lumière des avancées concernant l'utilisation de la bioaccessibilité : aucune règle formelle, avis, ni méthodologie n'est actuellement disponible sur ce site officiel.

#### iv) Pays-Bas :

Le RIVM a publié en 2006 un rapport dans lequel il recommande l'utilisation de la biodisponibilité relative dans les évaluations des risques sanitaires pour le plomb (13)(15)(16). Cette valeur peut être estimée grâce à la bioaccessibilité selon la relation suivante : Biodisponibilité relative = Bioaccessibilité / 0,5 (cf chapitre IV-4 « Etude »).

Selon les préconisations de ce rapport, l'utilisation de la notion de biodisponibilité relative doit se faire selon une démarche itérative en 3 étapes :



- Utilisation d'un facteur de biodisponibilité relative de 1 ;
- Si, suite au premier calcul, les risques sont inacceptables, il est recommandé d'utiliser des valeurs par défaut établies selon la quantité de matière organique du sol et selon le niveau de sécurité recherché par l'Autorité locale ;
- Si le 2e calcul montre également un risque inacceptable, alors il est possible d'utiliser des valeurs spécifiques au site en réalisant des mesures de bioaccessibilité *via* le test du RIVM.

En 2009, le RIVM a publié un second rapport (30) afin de déterminer le facteur correctif pour la biodisponibilité relative dans le cas spécifique d'une contamination par le plomb. Pour le type de sol étudié (remblais), la biodisponibilité relative a été estimée à partir du test de bioaccessibilité du RIVM, le résultat montre une valeur supérieure à 1 et donc un risque accru par rapport à l'ingestion de nourriture contaminée par le plomb. Le rapport met donc en avant l'importance de l'utilisation de la biodisponibilité, et par extension de la bioaccessibilité dans les évaluations de risque. Néanmoins, aucune méthodologie nationale concernant l'intégration des notions de bioaccessibilité et biodisponibilité ne semble avoir été officiellement établie aux Pays-Bas par les autorités gouvernementales.

#### v) France :

La bioaccessibilité n'est pas une notion intégrée dans la méthodologie nationale ministérielle d'évaluation des risques sanitaires de février 2007<sup>12</sup> (16).

Néanmoins, des institutions comme l'InVS, l'INERIS et certaines DRASS, ont intégré ponctuellement la notion de biodisponibilité et/ou bioaccessibilité à leur démarche d'évaluation des risques sanitaires :

- l'InVS, à travers l'utilisation du modèle IEUBK, tient compte de la biodisponibilité du plomb dans les sols pour l'estimation des plombémies (biodisponibilité bibliographique). L'InVS justifie même, pour certaines études<sup>13</sup>, l'utilisation d'une biodisponibilité plus faible que celle proposée dans le modèle IEUBK du fait de l'ancienneté de la pollution (la biodisponibilité absolue du plomb dans les sols et les poussières est alors établie à 20%, la valeur par défaut du modèle étant de 30%). En revanche, concernant le cadmium, une biodisponibilité du cadmium dans les sols de 100% a été utilisée, par défaut, pour l'estimation des doses d'exposition associées à cette substance ;
- certaines DRASS ont également ponctuellement utilisé ces notions dans leurs évaluations<sup>14</sup>. Dans ce cas, des données bibliographiques (non spécifiques) ont été retenues ;
- dans différents rapports d'étude et publications, l'INERIS recommande d'intégrer un facteur de biodisponibilité dans le calcul de la dose d'exposition par ingestion de sol. Toutefois, l'INERIS<sup>15</sup> reconnaît que les données disponibles pour renseigner de manière pertinente le facteur de biodisponibilité relative du polluant dans le sol sont rares, et que, par défaut, une valeur de 1 doit souvent lui être attribuée. L'INERIS souligne néanmoins que les connaissances se développent et que des données sont actuellement disponibles pour quelques substances : *« Pour certaines comme le plomb, des publications montrent l'importance de la prise en compte des informations disponibles sur le type de minéral en jeu dans l'exposition, pour réduire l'incertitude liée à la définition de ce paramètre et augmenter le degré de confiance dans l'estimation de la dose d'exposition et du niveau de risque (Glorennec, 2006). »*

<sup>12</sup> Outils et guides élaborés en 2007 par le ministère en charge de l'environnement pour la mise en œuvre des démarches de gestion des sites potentiellement pollués, en particulier le guide sur l'Analyse des Risques Résiduels (ARR) => Circulaire du 08/02/2007 relative aux Installations Classées. Prévention de la pollution des sols. Gestion des sols pollués.

<sup>13</sup> InVS, Ministère de la Santé, de la Jeunesse et des Sports (DRASS Nord-Pas-de-Calais, CIRE Nord-Pas-de-Calais), *Pertinence d'un dépistage du saturnisme et de mesures de l'imprégnation de la population en cadmium sur le secteur de Mortagne-du-Nord*,

<sup>14</sup> DRASS de Lorraine, *Pertinence de la mise en place d'une étude d'imprégnation à l'arsenic d'origine tellurique de la population lorraine* (ENSP, Hubert Boulanger)

<sup>15</sup> INERIS, *Mise à disposition et diffusion des outils de l'INERIS pour la modélisation des expositions liées à une source de pollution locale. Commentaires des relecteurs du rapport « Jeux d'équations pour la modélisation des expositions liées à la contamination d'un sol ou aux émissions d'une installation industrielle », version du 16/04/2009 et réponses apportées par l'INERIS*, Rapport d'étude n°DRC-10-109450-02656A du 01/08/2010.

Ainsi, en France, à défaut d'intégration de ces notions dans la méthodologie ministérielle de 2007, l'application des notions de biodisponibilité et bioaccessibilité est effective mais demeure ponctuelle dans les études d'exposition, les EQRS et les IEM<sup>16</sup>.

Seul l'INERIS, moteur en termes de recherche sur cette thématique, recommande et intègre ces notions dans les études d'exposition à certains polluants (Arsenic, Plomb). Les données utilisées sont rarement bibliographiques, mais issues de tests *in vitro* de bioaccessibilité menés par l'INERIS.

La France, *via* l'INERIS, participe aux travaux du groupe BARGE et s'oriente, comme beaucoup d'institutions européennes et internationales, vers une utilisation raisonnée de ces notions en vue de l'émergence de mesures de gestion plus réalistes, notamment sur les sites industriels où la pollution métallique est diffuse sur un périmètre étendu.

### **Conclusion :**

L'US-EPA est donc la seule agence gouvernementale ayant officiellement validé un test *in vitro* pour un élément inorganique : le plomb, en vue d'intégrer les notions de bioaccessibilité dans les évaluations de risque sanitaire. On notera d'une manière générale que les données disponibles de bioaccessibilité concernent essentiellement les éléments traces métalliques.

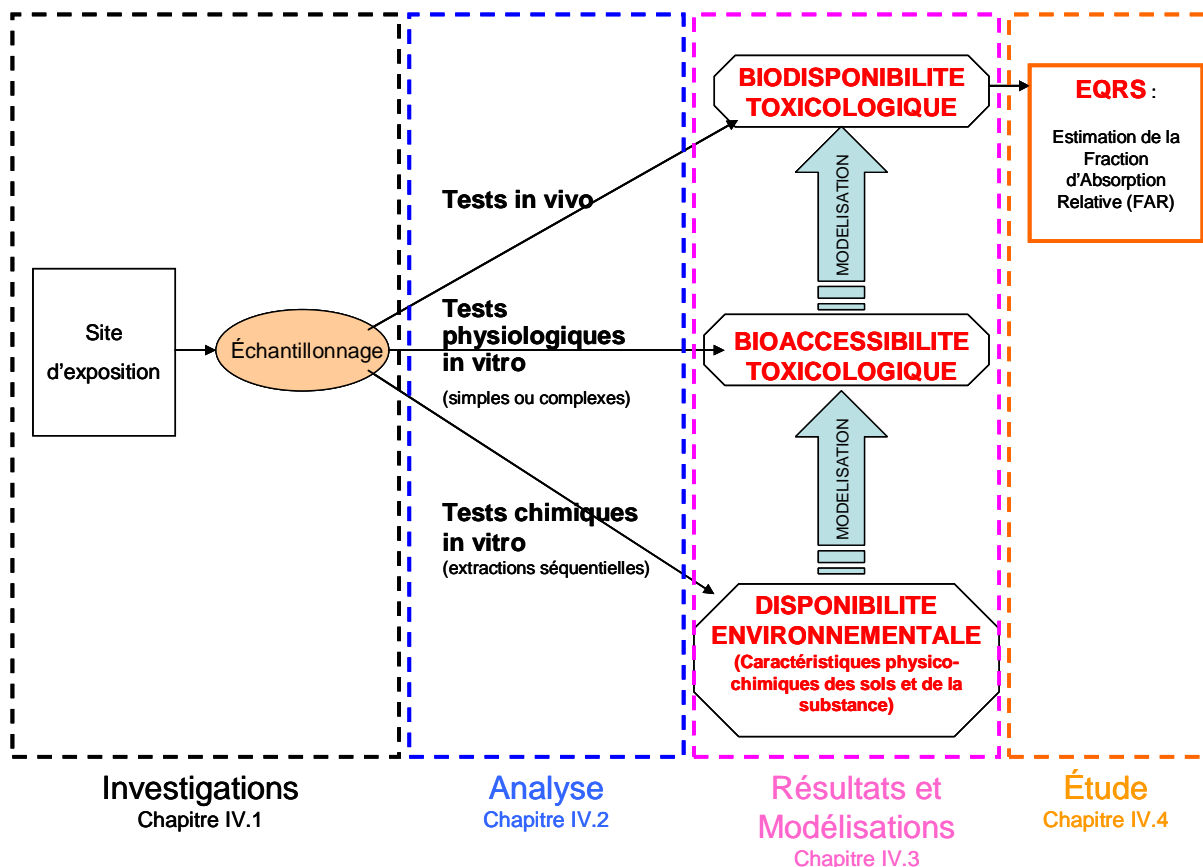
Des travaux de recherche sont actuellement en cours au niveau Européen (BARGE), au Canada (BARC) et aux USA (SBRC) en vue d'approfondir les connaissances sur la bioaccessibilité ou biodisponibilité des polluants inorganiques et de développer celles sur les polluants organiques, notamment sur les paramètres expérimentaux à appliquer et sur la validation de la représentativité physiologique des tests de bioaccessibilité (1).

---

<sup>16</sup> INERIS, « Intégration de la notion de bioaccessibilité dans la méthode d'interprétation de l'état des milieux. Illustration sur le site atelier de Saint Laurent le Minier », Colloque ADEME, 2009.

## IV. ETAT DE L'ART INTERNATIONAL EN MATIERE DE BIODISPONIBILITE ET BIOACCESSIBILITE D'UN CONTAMINANT DANS UN SOL

Ce chapitre, et les éléments qui vont être abordés sur l'état des connaissances en matière de biodisponibilité et bioaccessibilité sont présentés dans le schéma suivant.



### IV-1. Investigations sur site

Aujourd'hui, les données relatives à la bioaccessibilité sont parfois utilisées de manière inadéquate, en effet, certains évaluateurs de risque prennent des valeurs issues de la littérature et les appliquent à leur étude, sans tenir compte de la spéciation de la substance, des caractéristiques du site ou même de la voie d'exposition (33). Lors de la mise en œuvre de tests de bioaccessibilité, il est indispensable d'avoir une pleine compréhension des facteurs les plus influents sur les résultats des tests de bioaccessibilité en termes d'échantillonnage, de préparation, et d'analyse.

#### IV.1.1. Etude du site d'exposition

A l'instar de toute étude environnementale, une approche globale doit être menée : les résultats doivent être interprétés au regard du contexte géochimique du site, de l'historique des activités exercées sur le site, et de l'usage futur envisagé au droit de la zone d'étude (34).

Le site d'exposition est défini par ses usages, passés et futurs, les caractéristiques intrinsèques du sol qui le constitue et la nature des substances polluantes présentes.

Une étude historique et un diagnostic initial du site permettent d'identifier les zones à risque et les caractéristiques physico-chimiques des sols du site étudié. Un diagnostic approfondi, incluant, le cas échéant, un test d'extractions séquentielles et/ou un test physiologique *in vitro*, pourra ensuite être

réalisé au droit des zones identifiées comme les plus sensibles en termes de risque sanitaire si un contact direct avec les sols est potentiellement prépondérant lors du futur aménagement.

#### IV.1.1.1 Etude historique et documentaire

L'étude historique constitue l'une des premières étapes de la réalisation d'un diagnostic environnemental<sup>17</sup>. Elle comprend la recherche :

- des différentes activités présentes ou passées, sur le site et à proximité du site ;
- de leur localisation précise ;
- des polluants susceptibles d'y avoir été produits ou utilisés ;
- des pollutions accidentelles ou graduelles survenues sur le site ;

La date à laquelle les installations ont été mises en place est une donnée importante pour l'interprétation d'une mesure de bioaccessibilité car l'âge ou l'ancienneté d'une source de pollution influe sur la disponibilité environnementale d'un contaminant, et donc, potentiellement sur sa bioaccessibilité/biodisponibilité toxicologique (Cf. chapitre IV.3.1.3 sur les paramètres sensibles de la mesure de la bioaccessibilité).

Dans les publications recueillies lors de cette recherche, plusieurs types de sites et d'activités ont été étudiés, dont des sites miniers, des fonderies, des incinérateurs, des zones urbaines et des sites naturels (avec contamination géochimique). Chaque activité est associée à une pollution spécifique de l'environnement. Cette spécificité combine plusieurs éléments dont la nature des polluants rejetés et la forme chimique de chaque polluant.

Pour un même polluant rejeté, la forme chimique du contaminant est susceptible de varier en fonction de la source émettrice et/ou de l'activité considérée (35)(36), voire pour une même activité, en fonction des différents processus utilisés au cours du temps.

#### IV.1.1.2 Diagnostic initial et approfondi

##### *i) Propriétés du sol*

Au-delà de l'activité et du type de polluant, la nature du sol récepteur joue un rôle significatif dans la biodisponibilité/bioaccessibilité (Cf. chapitre IV.3.1.3 sur les paramètres sensibles de la mesure de la bioaccessibilité) et il semble donc important d'identifier le type de sol impacté. Un sol se caractérise par différents paramètres, qui sont en général déjà renseignés lors des investigations sur site. Il s'agit, *a minima* des paramètres suivants :

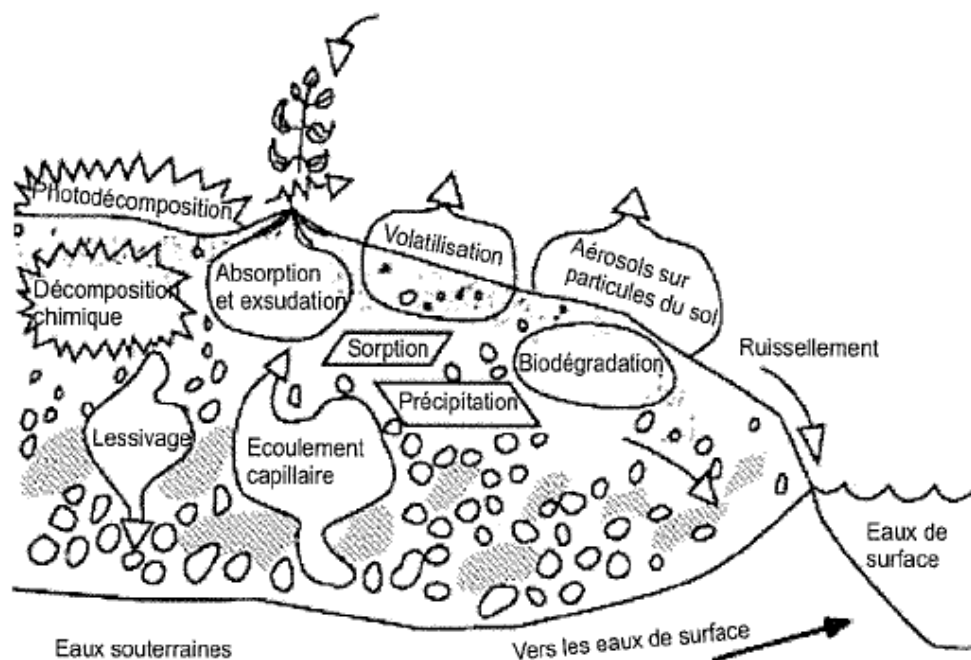
- contenu en argile, sable et limons (granulométrie)
- pH
- teneur en matières organiques
- teneur en eau

Le sol est composé, dans sa phase solide, d'une partie minérale (dans laquelle se trouve les carbonates, les argiles, des oxydes et hydroxydes métalliques, etc.) et d'une partie organique (débris végétaux, humus, etc.). Différents composants de ces parties peuvent interagir avec les contaminants (et notamment les éléments traces métalliques), pour en modifier la forme chimique ou spéciation<sup>18</sup> (18), selon divers processus (cf. Figure 7).

Les propriétés et composantes du sol et du contaminant sont donc interdépendantes, et directement associées à l'activité exercée au droit du site. C'est ce qui fait toute la spécificité de chaque site d'étude.

<sup>17</sup> [http://www.sites-pollues.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/Diagnostics\\_du\\_site\\_V0-022007-2.pdf](http://www.sites-pollues.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/Diagnostics_du_site_V0-022007-2.pdf)

<sup>18</sup> Il s'agit ici, et dans l'ensemble du présent rapport, de « spéciation » au sens large du terme, c'est-à-dire la répartition des éléments traces métalliques entre les diverses phases solides constitutives du sol. Il s'agit d'une définition opérationnelle de la spéciation, et non physico-chimique comme c'est le cas dans la définition au sens strict du terme. Cette spéciation peut être obtenue, entre autre, par la méthode chimique des extractions séquentielles (38)



**Figure 7 : Processus influant sur le comportement et la migration des contaminants au niveau du sol (source : BRGM (37))**

## ii) Le contaminant chimique

La nature des contaminants chimiques potentiellement présents doit être recherchée. Les activités passées et actuelles rencontrées sur le site orientent le choix des substances à rechercher (métaux et/ou contaminants organiques).

Une substance peut être caractérisée de deux manières différentes :

- par sa concentration totale
- par des concentrations spécifiques selon ses formes ou spéciations.

Concernant la mesure de la concentration totale d'un élément dans un sol lors des diagnostics environnementaux, celle-ci est d'ores et déjà réalisée en routine lors des diagnostics environnementaux, selon des techniques normalisées.

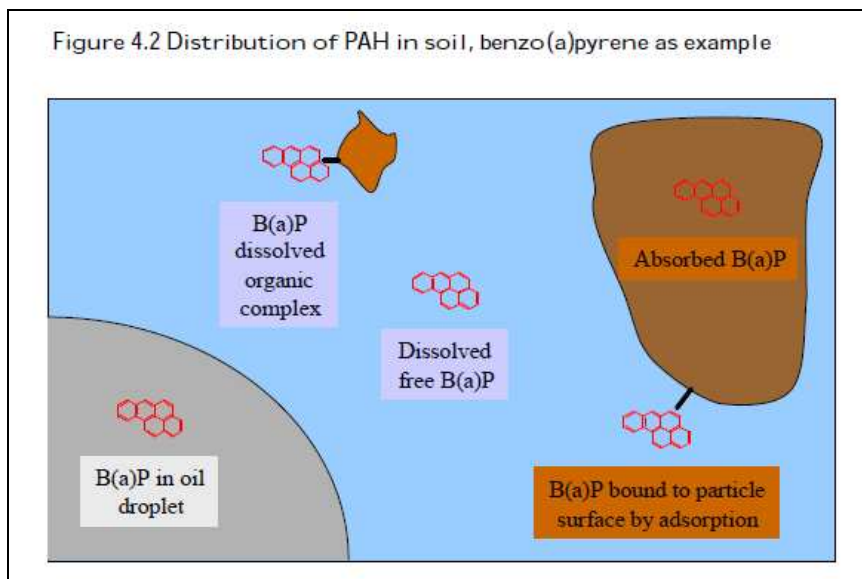
L'analyse de la répartition de la spéciation d'une substance ou la détermination des différentes formes d'un composé organique dans un sol sont, en revanche, des procédures moins établies.

La question de la spéciation des métaux peut être fréquemment rencontrée dans les études de pollution des sols. La spéciation peut être définie comme « l'étude des différentes formes chimiques et de leur mode de fixation sur les phases solides du milieu » (18).

Déterminer la spéciation d'un métal consiste à déterminer l'ensemble des interactions, de nature chimique ou biologique, dans lesquelles celui-ci est impliqué. Ces interactions peuvent avoir lieu avec d'autres composés inorganiques comme les carbonates, les chlorures mais également avec des molécules organiques comme les acides fulviques (9).

Concernant le cas des composés organiques, et notamment, les HAP, ceux-ci peuvent exister sous plusieurs formes (les auteurs parlent aussi de « spéciation ») qui conditionnent leur répartition (12). Les HAP sont principalement adsorbés à la matière organique du sol, du fait de leurs propriétés physico-chimiques mais, dans une moindre mesure, ils peuvent être liés à la matière organique

dissoute (formation d'un complexe soluble avec la matière organique), être dissous dans des gouttelettes d'huile, ou encore, être dissous en phase aqueuse (Cf. cas du benzo(a)pyrène en Figure 8).



**Figure 8 :** Distribution des HAP dans les sols, exemple du benzo(a)pyrène (extrait de Grøn et al. (12))

Les différentes complexations (complexes métalliques) et interactions (adsorption des molécules organiques) susceptibles de se produire dans les sols, entre un contaminant et les composants du sol ou d'autres contaminants, peuvent influencer significativement la disponibilité environnementale d'un polluant (Cf. chapitre IV.3.1.3 »). Ainsi, l'étude de la spéciation, *via* des extractions séquentielles, présente un réel intérêt dans un diagnostic de site. La spéciation, reflet de la disponibilité environnementale d'une substance, est une première étape dans l'étude de la bioaccessibilité et biodisponibilité toxicologiques d'un contaminant dans un sol.

Enfin, selon certains auteurs, l'étude de l'élément principal (ou élément d'intérêt) ne permet pas d'acquérir suffisamment d'informations pour réaliser une évaluation des risques (39)(34). Ainsi, l'étude d'autres éléments traces ou éléments secondaires (sulfates, oxydes, carbonates, autres substances inorganiques ou organiques...), dans les sols et dans la fraction bioaccessible, pourrait être utile à l'interprétation des données de façon éclairée.

#### IV.1.2. Echantillonnage

Une fois la caractérisation du site effectuée (historique, nature et localisation des sources de pollution), l'échantillonnage est mis en œuvre, et les échantillons de sol collectés doivent être représentatifs du site et/ou de la (ou des) zone étudiée(s) (34).

Selon certains auteurs, et à l'instar de toute étude environnementale bien menée, il convient d'avoir un protocole d'échantillonnage qui inclut des duplicata, d'utiliser un matériel adéquat et une méthodologie rigoureuse afin d'éviter des contaminations croisées (notamment sur les sites avec des contaminations très hétérogènes), d'avoir des enregistrements spatio-temporels précis sur la nature de l'échantillon (sa localisation, la date de prélèvement, sa description organoleptique, le contexte environnemental général, les conditions climatiques, etc.) (34).

Dans le cadre d'un contact direct par ingestion de sol, l'échantillonnage est réalisé de préférence dans la couche superficielle des sols, soit entre 0 et 10 cm en général (25)(40)(41)(42).

Une mauvaise campagne d'échantillonnage peut conduire à une mauvaise représentativité de la zone d'étude, et par extension à une mauvaise interprétation des données de bioaccessibilité, notamment

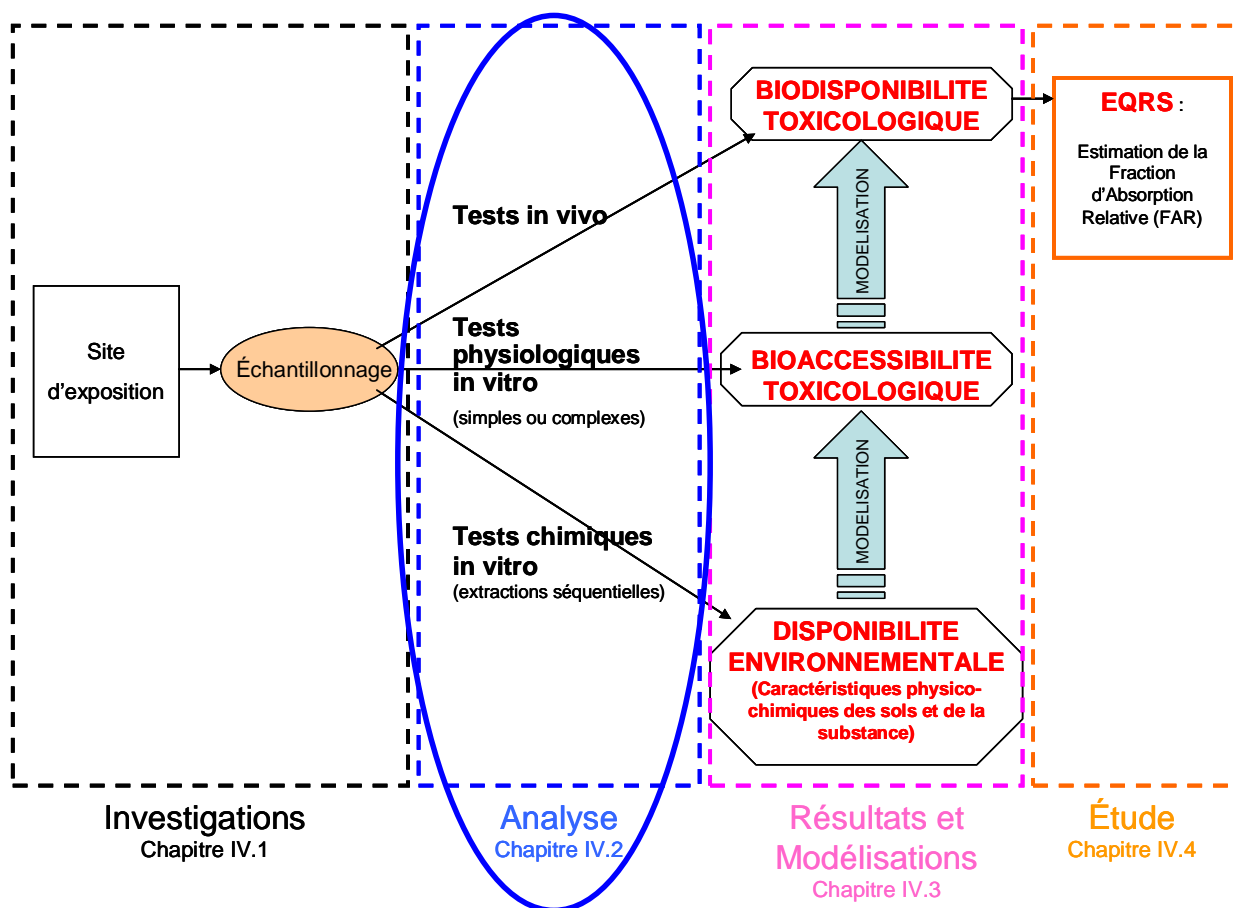
si le nombre d'échantillons est insuffisant, ou s'ils ont été « poolés » (échantillon composite) alors qu'il existe des propriétés du sol différentes à différents endroits du site étudié (33). Cependant, dans le cadre d'études « de recherche » sur la bioaccessibilité, il convient de remarquer qu'une grande majorité des auteurs ont utilisé des échantillons composites (30)(35)(36)(40)(41)(42)(43).

En parallèle des échantillons du site, Wragg *et al* recommandent de mener des analyses sur un sol de référence, certifié en termes de concentration totale et bioaccessibilité de l'élément recherché. Ceci permettrait de contrôler la validité des mesures analytiques réalisées par le laboratoire (34). De plus pour une meilleure interprétation des résultats spécifiques au site investigué, l'étude d'un site témoin (hors influence de la source de pollution) peut être envisagée en parallèle. Les échantillons de la zone témoin devront alors être comparables à ceux du site étudié (hormis la pollution) et prélevés dans des conditions similaires.

Les échantillons sont ensuite conservés puis acheminés jusqu'au laboratoire pour mener les différentes analyses jugées nécessaires.

A noter que, dans les articles étudiés, les échantillons de sol, une fois arrivés au laboratoire, sont tamisés afin de ne collecter que la fraction en général inférieure à 250µm pour les tests *in vitro* de bioaccessibilité, car elle représente la fraction qui adhère aux mains et qui est donc la plus susceptible d'être ingérée par un contact main/bouche (14)(21)(23)(35)(44)(45). D'autres auteurs préconisent cependant d'utiliser des fractions plus fines comme celle <45 µm (notamment pour les HAP) (46).

## IV-2. Analyse



Concernant les approches expérimentales d'étude de la biodisponibilité, deux catégories d'essais peuvent être distinguées :

- des essais *in vivo*,
- des essais *in vitro*.

Les essais *in vivo* ont pour objectif de mesurer la **fraction biodisponible** et utilisent le plus souvent des modèles animaux (mammifères) dont le système digestif est proche de celui de l'Homme (Cf. section IV.2.1).

De nombreux tests *in vitro* simulant les conditions physiologiques du système digestif humain (avec ou sans analogues intestinaux) ont aussi été développés en vue de mesurer la **bioaccessibilité** d'une substance, et ainsi, d'approcher sa biodisponibilité (Cf. chapitre IV.2.2).

## IV.2.1. Essais *in vivo* : mesure de la biodisponibilité

### IV.2.1.1 Généralités

Comme précisé dans le chapitre II, les essais *in vivo* sur des organismes de substitution sont utilisés pour étudier les effets liés à l'exposition d'autres organismes vivants (ex : Homme) et notamment pour étudier la biodisponibilité orale de contaminants des sols.

Deux types de biodisponibilité, définis préalablement peuvent être distingués (Cf. chapitre III-2) :

- la biodisponibilité absolue,
- la biodisponibilité relative.

La mesure de la **biodisponibilité absolue** lors d'essais animaux nécessite le suivi des cinétiques sanguines. La matrice contaminée est ingérée et une quantité approximativement identique est injectée par voie intraveineuse (*via* une solution où le contaminant est dissous). La concentration dans le sang du contaminant est mesurée au cours du temps et la biodisponibilité est calculée comme un ratio entre les aires sous la courbe de concentration après administration par voie orale et par intraveineuse (12)(47).

Néanmoins, cette technique, en plus de nécessiter un savoir-faire expérimental de pointe (nombreuses prises de sang) est difficile à mettre en œuvre, notamment pour les éléments traces métalliques des sols. En effet, parmi ceux-ci, certains ont de très faibles taux d'absorption (ex : cadmium, antimoine), et donc de très faibles concentrations dans le sang, possiblement en deçà des limites de quantification analytiques (18).

Ainsi, dans la plupart des études *in vivo* portant sur l'étude de la biodisponibilité des éléments métalliques des sols, il s'agit d'étudier la **biodisponibilité relative**. Deux approches spécifiques peuvent être utilisées pour évaluer cette biodisponibilité relative : les mesures d'excrétion et les mesures dans les tissus et/ou organes cibles (12)(47) :

- pour une mesure d'excrétion, les animaux sont nourris avec la matrice contaminée et les diverses fractions excrétées sont mesurées (fèces, urine). La fraction retenue (ou non excrétée) est la fraction biodisponible. La biodisponibilité relative correspondra aux quantités de contaminant non excrétées *via* l'urine et/ou les fèces après ingestion de sol et de la forme de référence.
- pour une mesure dans un tissu et/ou organe cible, la matrice contaminée est ingérée et, après un laps de temps préétabli, la concentration résultante est mesurée dans un compartiment cible, tel que le foie, par exemple, pour un composé à l'origine de cancers hépatiques.

Dans ces cas, ce n'est pas la fraction biodisponible qui est mesurée mais il est admis que la concentration mesurée dans un compartiment cible est proportionnelle à la fraction biodisponible pour une dose d'exposition identique d'un contaminant ingéré *via* le sol ou une forme de référence (18). La biodisponibilité relative sera calculée par le rapport des doses produisant une augmentation égale de la concentration d'un contaminant donné entre le sol et la forme de référence dans le compartiment cible étudié (18).



#### IV.2.1.2 Les modèles animaux utilisés

Une étude *in vivo* a été menée chez des adultes volontaires âgés de 21 à 40 ans (48) et a été réalisée à partir d'isotopes stables de plomb ( $^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ ) pour évaluer la biodisponibilité de cet élément dans un sol résidentiel à proximité d'un ancien site minier. Le sol a été ingéré *via* des capsules de gélatine. Le sang et les urines ont été collectés après 30 heures et analysés. Néanmoins, ce type d'étude reste rare du fait des problèmes éthiques évidents.

Les tests *in vivo* chez l'animal sont considérés comme appropriés pour évaluer la biodisponibilité (relative) chez l'Homme, puisque l'absorption mesurée chez l'animal va rassembler l'ensemble des conditions appliquées au cours des essais de toxicité. Les animaux sélectionnés pour ces études doivent avoir un système digestif proche de celui de l'Homme :

- porcs,
- rats,
- lapins blancs de Nouvelle Zélande,
- singes.

Parmi les animaux utilisés, beaucoup d'études ont recours au modèle porcin pour étudier la biodisponibilité des métaux lourds dans le sol. Le système digestif des porcs montre des différences anatomiques avec l'Homme, cependant, la physiologie de la digestion reste globalement semblable à celle de l'homme (49). Le fait que les porcs soient des omnivores tout comme les Hommes conforte également le choix de cet animal comme principal modèle. Notons cependant que, notamment dans les études de bioaccessibilité impliquant l'arsenic, le modèle primate a également été employé.

Les résultats des études de biodisponibilité dépendent des modèles animaux choisis. Ceci nécessite donc une parfaite compréhension des mécanismes d'absorption et des éventuelles différences existant entre les animaux sélectionnés et l'Homme, lesquelles peuvent être également dépendantes des contaminants étudiés. Par exemple pour l'arsenic les modèles rongeurs sont déconseillés. En effet, une large quantité d'arsenic restant liée aux cellules sanguines de ces animaux, les quantités dans les organes cibles sont très faibles, à l'inverse de ce qui est observé chez l'Homme (études reportées par Caboche (18)).

D'autres facteurs sont également à considérer :

- l'âge des animaux (par exemple, le plomb est mieux absorbé chez les jeunes animaux),
- leur état nutritionnel ainsi que leur type d'alimentation (par exemple, le plomb est mieux absorbé chez les animaux à jeun).

Caboche (18) indique que les modèles primate et porcelet sont les seuls considérés comme ayant une réalité physiologique et anatomique pour simuler le tractus gastro-intestinal de l'enfant. Le modèle primate étant toutefois plus lourd à mettre en œuvre (coût des animaux plus important, contraintes spécifiques liées à leur utilisation, contraintes éthiques), le modèle porcelet est le plus employé. L'US EPA a d'ailleurs utilisé le modèle porcelet pour déterminer la biodisponibilité du plomb dans les sols (50).

Les modèles animaux sont donc très employés mais peuvent toutefois donner des estimations de biodisponibilité (relative) non équivalentes à celles de l'Homme. A ce titre, il faut noter qu'aucune étude n'a comparé les résultats obtenus chez des animaux à ceux observés chez l'Homme concernant la biodisponibilité de contaminants ingérés *via* des sols.

## IV.2.2. Essais *in vitro* : mesure de la bioaccessibilité

La recherche bibliographique effectuée a permis de recenser différents essais physiologiques *in vitro* (se déroulant à 37°C) de bioaccessibilité dont, pour rappel :

- des essais physiologiques simples ne simulant que la phase gastrique et utilisant peu de réactifs (HCl, glycine, phosphate),
- des essais physiologiques avec analogues gastro-intestinaux (ex : enzymes, sels biliaires) simulant au moins deux phases (gastrique et intestinale).

Ces essais ont été développés par différents auteurs internationaux, depuis les années 90 environ. Des protocoles sont ainsi disponibles dans la littérature. Ces tests *in vitro* sont présentés dans le Tableau 2.

**Tableau 2 : Liste des tests physiologiques simples et avec analogues gastro-intestinaux de mesure de la bioaccessibilité recensés dans la littérature.**

	Tests physiologiques	Simple	Avec analogues gastro-intestinaux	Pays de développement
1	Test d'extraction basé sur l'approche physiologique (PBET)		X	Etat-Unis
2	PBET modifié par Drexler		X	Etat-Unis
3	Test de bioaccessibilité simplifié (SBET du SBRC également appelé RBALP) Et ses variantes « Exponent phosphate » et « Exponent Glycine »	X		Etat-Unis <sup>19</sup>
4	Méthode gastro-intestinale <i>in vitro</i> (IVG)		X	Etat-Unis
5	Norme DIN 19738		X	Allemagne
6	Modèles de digestion de l'Institut National de la Santé Publique Néerlandais (RIVM) : test à jeun et test avec nourriture		X	Pays-bas
7	Protocole unifié du groupe BARGE : test UBM Europe		X	Europe
8	Protocole FOREhST (Fed Organic Estimation human Simulation Test) : test avec nourriture		X	Grande-Bretagne
9	Simulation de l'écosystème microbien intestinal humain chez l'enfant (SHIME)		X 1 partie dynamique	Belgique
10	Modèle gastro-intestinal du laboratoire TNO (TIM)		X dynamique	Belgique
11	Méthode pharmacopée US (USP XII 1990)		X	Etat-Unis
12	Méthode du bilan de masse (BM) et de la recapture de sol (RS)		X	Etat-Unis
13	Test de digestibilité de la pepsine (AOAC 2000)		X	Etat-Unis

Parmi ceux-ci, la plupart correspond à des essais statiques mais quelques-uns sont réalisés en dynamique (essai TIM n°10, essai SHIME dynamique n°9). Ces deux derniers tests ont été initialement développés pour réaliser des études de nutrition. Ces deux essais ont également pour originalité de permettre l'introduction d'une flore microbienne représentative du tube digestif.

Les 7 premiers essais (numérotés de 1 à 7) sont les plus employés : ils sont présentés par ordre chronologique de développement. Les trois derniers (numérotés de 11 à 13) sont *a priori* plus rarement utilisés (moins de résultats disponibles).

A noter que certains de ces essais sont issus de modifications d'autres précédemment développés (ex : UBM et FOREhST issus des tests RIVM, SBET issu du PBET). Le protocole FOREhST est,

<sup>19</sup> L'US EPA a reconnu officiellement l'utilisation de RBALP pour la réalisation d'étude de risque associée au plomb.

semble t-il, le dernier à avoir été développé afin d'étudier la bioaccessibilité des molécules organiques, en particulier les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).

#### IV.2.2.1 Généralités

Les principes généraux de l'ensemble des essais physiologiques de bioaccessibilité *in vitro* avec analogues intestinaux sont les suivants :

- l'objectif des essais est de mimer les conditions physiologiques se déroulant dans le corps humain, en particulier chez les enfants, considérés comme la population potentiellement la plus exposée à des contaminants du sol *via* ingestion. Ces essais ont, pour la plupart, été développés pour étudier la bioaccessibilité de contaminants (inorganiques au départ) dans des sols. Certains ont toutefois été initialement développés dans le cadre d'études de nutrition (SHIME, TIM),
- le sol potentiellement contaminé, après séchage et tamisage (en général), est introduit dans de la verrerie adaptée à chaque essai et est mis en contact avec des solutions digestives représentatives des conditions physiologiques des différents segments gastro-intestinaux étudiés. La composition de ces solutions digestives est propre à chaque essai,
- les segments les plus étudiés (dans le plus grand nombre d'essais) sont l'estomac et l'intestin grêle (segments majoritairement impliqués dans l'absorption des contaminants dissous (8)). Une phase salivaire a été introduite dans certains essais (ex : RIVM, UBM, DIN). Dans d'autres, plusieurs segments de l'intestin grêle (= petit intestin) ou du colon ont été distingués (ex : TIM, SHIME),
- des ajustements de pH sont réalisés à chacune des étapes afin d'être représentatif des pH physiologiquement rencontrés (*cf.* Tableau 3). Des pH faibles (entre 1 et 2,5 en général selon les essais) sont utilisés pour les phases stomacales et des pH plus élevés (entre 5,5 et 7,5) pour les phases intestinales. Pour les essais mimant également une phase salivaire, le pH utilisé est de 5,5 ou 6,5.
- les milieux sont agités aux moyens d'agitateurs magnétiques, à pâle, plateformes agitées ou par rotation (*end over end*<sup>20</sup>) afin de mimer le péristaltisme physiologique,
- les essais sont réalisés soit en conditions anaérobies (utilisation de gaz argon ou nitrogène) soit en conditions aérobies,
- les étapes se déroulent à une température de 37°C,
- les temps de résidence dans chaque segment étudié varient avec les essais : ils sont courts (quelques minutes) pour les phases salivaires, de 1 à 2,5 H pour les phases stomacales et de 2 à 18 H pour les phases intestinales,
- la plupart des essais sont conduits en simulant une exposition à jeun mais certains permettent l'introduction d'aliments (ex : DIN, introduction possible de lait en poudre), l'objectif étant également de se placer dans des conditions représentatives de la réalité. Les aliments, selon que les contaminants du sol sont de nature inorganique ou organique, peuvent *a priori* induire une diminution ou une augmentation de la part bioaccessible (51)(52),
- des échantillons sont prélevés après les différentes étapes de digestion mises en œuvre (sauf après la phase salivaire) afin, en général, d'évaluer une bioaccessibilité stomacale et une bioaccessibilité intestinale,

---

<sup>20</sup> L'agitation *end over end* correspond à une agitation par retournement (agitation de type vertical contrairement aux agitations de type horizontal obtenues avec plateforme agitée, pâle ou agitateur magnétique).

- ces échantillons sont, avant mesure des concentrations, centrifugés et /ou filtrés, puis conservés à 4°C ou sont stabilisés par une attaque acide (pour l'étude des métaux),
- les extraits ainsi obtenus sont analysés selon des méthodes adéquates. En général, les auteurs recommandent d'utiliser des méthodes normalisées (variables en fonction des pays) et permettant d'atteindre des limites de quantification suffisamment faibles<sup>21</sup>.
- de manière générale, les résultats issus des tests *in vitro* sont exprimés comme étant la fraction bioaccessible (FAB) en % selon l'équation suivante (52) :

$$\text{FAB (\%)} = ([\text{Elément}]_{\text{bioaccessible}} / [\text{Elément}]_{\text{total}}) \times 100 \quad [\text{Équation 5}]$$

Avec :

$[\text{Elément}]_{\text{bioaccessible}}$  = concentration en élément ou substance extraite après la phase stomacale ou intestinale

$[\text{Elément}]_{\text{total}}$  = concentration en élément ou substance présente initialement dans le sol (mesurée selon méthodes analytiques classiquement employées)

Les concentrations en élément ou substance bioaccessible sont aussi précisées et exprimées en mg ou µg/kg de matières sèches (MS).

A noter que ces essais permettent de déterminer la bioaccessibilité absolue des contaminants dans une matrice donnée. Des bioaccessibilités relatives peuvent ensuite être calculées en référence, par exemple, à un autre sol (sol témoin) ou une autre matrice (ex : matrice de référence utilisée dans des essais de biodisponibilité *in vivo* et/ou celle utilisée pour déterminer la valeur toxicologique de référence) (13)(53)(54).

---

<sup>21</sup> Les méthodes analytiques de dosage des molécules ne sont pas traitées dans le cadre de ce rapport.

**Tableau 3 : Principales caractéristiques des processus se déroulant dans le tube gastro-intestinal de l'Homme (d'après Caboche (18)) et <http://www.cap-sciences.net/upload/digestion.pdf>; consulté le 21/03/2011).**

Compartiments		Temps de résidence	pH	Processus mécaniques	Sécrétions	Productions et enzymes	Dégradation chimique	Effets sur la dissolution des contaminants inorganiques (Caboche, 2009)
Bouche		quelques secondes à quelques minutes	6,5	broyage	salive	bol alimentaire amylase	hydrolyse amidon en maltose	L'écrasement améliore ensuite la dissolution,
Oesophage		quelques secondes		péristaltisme				
Estomac		8 à 15 minutes (à jeun, selon Caboche, 2009) 1 à 2 H selon Gron (2005)	1-2 (à jeun)	malaxage	suc gastrique	chyme acide chlorhydrique, mucus lipase, pepsine, présure	hydrolyse des graisses et protéines coagulation des protéines	Les acides dissolvent les oxydes labiles, les sulfates et carbonates : libération des métaux
Intestin grêle (petit intestin)	Duodénum	0,5 à 0,75 H	4-5,5	péristaltisme	suc intestinal bile suc pancréatique	saccharase, lactase, petidase sels biliaires protéase, lipase, amylase	hydrolyse des sucres, graisses et protéines coagulation des protéines émulsion des lipides	La matière organique du sol est dissoute, les contaminants liés à celle-ci sont libérés. Les métaux cationiques sont solubilisés par complexation aux acides biliaires. Certains métaux précipitent du fait de pH élevés ou de la teneur en phosphate (ex : Pb). Absorption des contaminants libérés de la matrice sol.
	Jéjunum	1,5 à 2,0 H	5,5-7,0					
	Iléon	5 à 7 H	7,0-7,5					
Colon (gros intestin) et rectum		1 à 60 H	7,0-8,0	péristaltisme	présence d'une flore intestinale	"bactéries"	fermentation des fibres alimentaires, acide lactique, acides gras dégradations bactériennes réabsorption d'eau, absorption des sels minéraux	

#### IV.2.2.2 Présentation des essais

Chacun des tests *in vitro* de bioaccessibilité est détaillé en ANNEXE 2. Les éléments présentés sont issus :

- des publications décrivant les essais. Les protocoles initiaux ont été dans la mesure du possible recherchés,
- de travaux de synthèse conduits par divers organismes (ex : BGS : British Geological Survey, INERIS : Institut National de l'Environnement industriel et des risques) ou dans le cadre de thèses (ex : Caboche (18)).

Comme déjà évoqué, certains essais sont issus de modifications de protocoles antérieurement développés. De plus, selon les équipes mettant en œuvre les essais, diverses variantes sont parfois intégrées aux protocoles initiaux (modifications de quelques paramètres tels que le pH, ou les

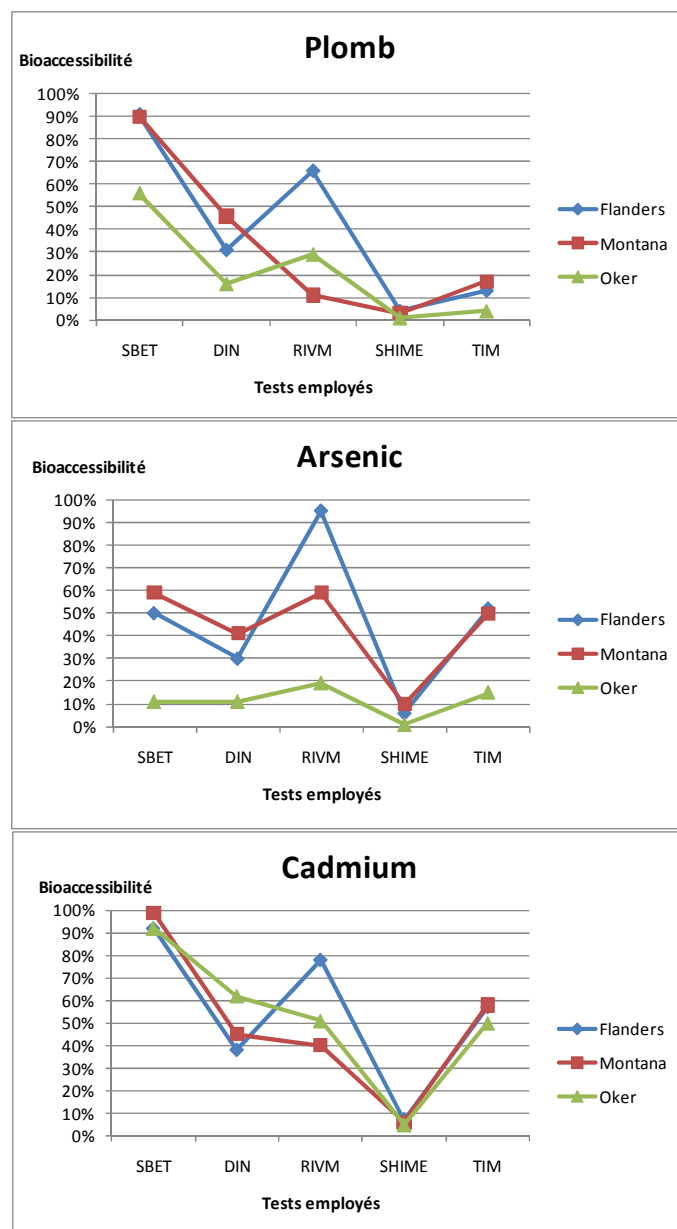
concentrations dans les solutions digestives). Des schématisations de chacun des protocoles « initiaux » sont également présentées en ANNEXE 2. Celles-ci sont directement tirées des documents disponibles, ou, ont été réalisées d'après les descriptions qui en étaient faites. Certains éléments particuliers ou difficultés liés à chaque protocole sont également soulignés.

Les principales caractéristiques de ces tests *in vitro* sont présentées sous forme de tableaux récapitulatifs et commentées au chapitre IV.2.2.3.

### IV.2.2.3 Comparatif des protocoles

Pour un même polluant dans un même type de sol, les résultats de bioaccessibilité varient en fonction des essais mis en œuvre, et ceci dans des proportions parfois importantes. A titre d'illustration de ce constat, la Figure 9 indique, pour le sol « Flanders », les valeurs de bioaccessibilité suivantes, valeurs mesurées *via* cinq tests *in vitro* mis en oeuvre par Oomen *et al.* (51) :

- pour le plomb, de 4 (SHIME) à 91 % (SBET),
- pour le cadmium, de 7 (SHIME) à 92 % (SBET),
- pour l'arsenic, de 6 (SHIME) à 95 % (RIVM).



	SBET	DIN	RIVM	SHIME	TIM
pH gastrique	1,5	2	1,1	4	5 puis 3,5 puis 2,5 puis 2

**Figure 9 :** Résultats de bioaccessibilité du plomb, de l'arsenic et du cadmium obtenus par la mise en œuvre de 5 essais *in vitro* (SBET, DIN, RIVM, SHIME et TIM) par Oomen *et al.* (51).

La question est donc de savoir quel protocole employer ?

Dans un premier temps, et à titre de comparaison, les sections suivantes récapitulent les principales caractéristiques et les paramètres sensibles de chacun des essais de bioaccessibilité.

Dans un deuxième temps, une étude relative à la validation des protocoles est proposée au chapitre IV.2.2.4.

**i) Principales caractéristiques des essais**

Le Tableau 4 récapitule les principales caractéristiques des essais de bioaccessibilité précédemment décrits, en termes de :

- segments étudiés, pH et temps de résidence,
- type et vitesse d'agitation,
- ratio liquide : solide entre les solutions digestives et la matrice (sol) introduite,
- ajout de nourriture,
- propriété du sol,
- type de verrerie utilisée,
- nécessité en matériel lourd et autres matériels ou consommables particulier (ex : utilisation de gaz ou non).

Le Tableau 5 fournit la composition des solutions digestives employées dans chacun des essais. Les solutions digestives sont composées :

- d'acide chlorhydrique ou bicarbonate de sodium selon qu'elles correspondent à la phase gastrique ou intestinale,
- d'autres sels inorganiques,
- d'enzymes,
- d'autres constituants.



Tableau 4 : Principales caractéristiques des essais physiologiques de bioaccessibilité <i>in vitro</i> avec analogues gastro-intestinaux.													
Méthodes	PBET "Ruby"	PBET modifié = SBET	PBET modifié par Drexler	IVG	DIN 19738	RIVM sans nourriture	RIVM avec nourriture	UBM	FOREhST	SHIME	TIM	Méthode Pharmacopée	Bilan de masse et recapture du sol
Références	(Ruby, 1993 et 1996)	Batelle et Exponent, 2000 adapté par Schoff, 2003	Batelle et Exponent, 2000 adapté par Schoff, 2003	Rodriguez <i>et al.</i> , 1999	Norme	Oomen <i>et al.</i> , 2003	Gron (2005) et Oomen <i>et al.</i> , 2006	Caboche, 2009	Cave <i>et al.</i> , 2010	Laird <i>et al.</i> , 2007	Oomen <i>et al.</i> , 2002	Hamel et al., 1998	Hamel <i>et al.</i> , 1999 et Ellickson <i>et al.</i> , 2001
Types d'essais	statique	statique	statique	statique	statique	statique	statique	statique	statique	dynamique/ statique	dynamique	statique	statique
Segments digestifs	Estomac Intestin	Estomac	Estomac Intestin	Estomac Intestin	Salive (fac.) Estomac Intestin	Salive Estomac Intestin avec "Bile"	Salive Estomac Intestin avec "Bile"	Salive Estomac Intestin	Salive Estomac Intestin	Estomac Petit intestin Colon	Salive Estomac Duodénum Iléum Jéjunum	Estomac	Salive Estomac Intestin
pH	2,5 7	1,5	2 7	1,8 5,5	Non déterminé 2 7,5	6,5 1,2 >5,5	6,8 1,3 8,1	6,5 1,2-1,7 5,8-6,8	6,8 1,3 8,1	1,5 6,2 5,9	5 5 à 2 6,5 6,8 7,2	non précisé	Non déterminé 1,4 6,5
Température	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C
Introduction de nourriture (oui/non)	Non	Non	Non	Possible ("aliment utilisé pour nourrir les animaux des tests <i>in vivo</i> ")	Possible (lait en poudre)	Non dans cette version	Oui (version pour molécules organiques : nourriture pour bébés)	Non	Oui (mélange de nourriture pour bébé, avoine séchée et huile de tournesol)	Possible	Possible	Non	Non
Utilisation de gaz	Argon	Non	Argon	Argon	Nitrogène (facultatif : à des fins spécifiques)	Non	Non	Non	Non	Nitrogène	Non	Non	Non
Quantité de sol introduite	0,4 g	1 g	1,5 g	4 g	2 g	0,6 g (ou 0,06 g)	0,4 g (ou 0,04 g)	0,6 g	0,3 g	0,15 g	10 g	0,05 ou 0,5 g	0,05 g
Ratios liquide : solide par segment	100 : 1 100 : 1	100 : 1	100 : 1 100 : 1	150 : 1	15 : 1 50 : 1 100 : 1	15 : 1 (ou 150 : 1) 37,5 : 1 (ou 375 : 1) 97,5 : 1 (ou 375 : 1)	idem version sans nourriture <i>a priori</i>	15 : 1 37,5 : 1 97,5 : 1	non précisé	40 : 1 60 : 1 100 : 1	5 : 1 9,5 : 1 45,5 : 1 (intestin)	100 : 1 à 5000 : 1	160 : 1 2160 : 1 4160 : 1
Propriétés du sol	sec (24 H à 50 °C)  < 250 µm	< 250 µm		sec (air ambiant)  < 250 µm	sec  < 2 mm possible mais en général < 1 mm	sec  < 1 mm		sec  < 250 µm	sec  < 250 µm	sec  < 38 µm	non indiqué	entre 150 et 250 µm < 74 µg (sol de référence)	< 125 µm < 74 µm pour un sol de référence
Temps de résidence par segment	1 H 3 H après avoir atteint pH de 7	1 H	1 H 3 H après avoir atteint pH de 7	1 H 1 H	30 min 2 H 6 H	5 min 2H 2H		5 min 1 H 4H	5 min 2H 2H	2,5 H 3H 18H	5 min 1,5 H 6H (intestin total)	2H	5 s 2H 2H + 2H
Autres temps de manipulations déterminés (repos, centrifugation, ...)	10 min (repos) indéterminé		10 min (purge à l'argon)	15 min (centrifugation)	10 min (centrifugation) 12 min ou 2 H agitation culot + 10 min centrifugation	5 min (centrifugation)		5 min (centrifugation)	<i>A priori</i> comme RIVM	3 semaines pour communauté microbienne  2 ou 3 x 30 min (conditions anaérobies) 20 min (centrifugation)		10 min (centrifugation)	20 min + 2 x 15 min (centrifugation)
Temps total comprenant temps de résidence et autres manipulations avec temps déterminés	4H10	1H	4H10	2H15	> 9H	4H10		5H10		23H50 (+ 3 semaines pour Shime dynamique)	7H35	2H10	6H50
Agitation (type/vitesse)	Bullage argon	Rotation (30 rpm)	Agitateur à pale	Agitateur à pale (100 rpm)	Agitateur plateforme ou agitateur magnétique	Rotation (55 rpm)		Rotation (55 rpm)		Agitateur magnétique		bain d'eau agité (90 cycles/min)	bain d'eau agité (90 cycles/min)
Traitements des échantillons avant mesures des concentrations	Centrifugation	Filtration	Filtration	Centrifugation	Centrifugation	Centrifugation		Centrifugation		Centrifugation et ultrafiltration		Centrifugation	Centrifugation et filtration
Verrerie	Ampoules à décanter	Bouteille Nalgene 125 mL – col large avec bouchon	Verrerie en acrylique scélée (vol 150 mL) avec septums pour contrôle pH, passage agitateur, et argon	Flacons / Bocaux verre - 1 L	Flacons verre ou PE (selon molécules recherchées) avec bouchon - 500 mL	Tubes à centrifuger en polycarbonates 85 ou 94 mL	Tubes à centrifuger <i>a priori</i> comme RIVM : en polycarbonates 85 ou 94 mL	Incubateur agité ou bain thermostaté		centrifugeuse (12000 g et 3000 rpm)	dispositif adapté (mouvements péristaltiques reproduits, valves, membrane intestinale)	Bouteille Nalgène > 100 mL Tubes à centrifuger de 15 mL	Bouteille Nalgène de 250 mL Tubes à centrifuger de 15 mL
Matériel lourd	Bain thermostaté Centrifugeuse (2100 g)	Bain thermostaté en rotation	Bain thermostaté	Centrifugeuse (5211g)	Bain thermostaté plus ou moins important  Centrifugeuse (7000 g)	Incubateur agité ou bain thermostaté  centrifugeuse (3000 g)							
Autres matériels spécifiques	Sac à dialyse	Seringue filtrante	Sac à dialyse Seringue filtrante										
Nb de réplicats décrits dans les travaux des auteurs	Ruby <i>et al.</i> , (1996) ont effectué des duplicats ou triplicats avec des pH gastriques différents (selon sol testés)	1 par série et au moins 1 par 10 échantillons (Gron, 2005)	triplicat	duplicats "adéquats" pour satisfaire au contrôle qualité (détails non fournis)	duplicat ou triplicat (si sol non homogène)	2 sous échantillons - 5 réplicats pour chacun		2 sous échantillons - 5 réplicats pour chacun		triplicats	duplicat tous les 10 échantillons traités	non précisé	non précisé
Blancs/ échantillons de référence	non précisé	non précisé	non précisé	adéquats pour satisfaire au contrôle qualité (détails non fournis)	blanc/sol de référence non requis  bilan de masse : 1 par 20 échantillons	1 blanc par série  1 sol référence par série (Montana 2711 du NIST)  bilan de masse : 1 par série	1 blanc par série  2 sols de référence par série ( Montana 2711 et SMR 2710 du NIST)  bilan de masse : 1 par série	blanc		non précisé		non précisé	Blancs et témoins positifs (détails non fournis)
Autres commentaires	Ajustement pH toutes les 10 min pendant 1 H  attente atteinte pH 7 au début phase intestinale, parfois long selon Wragg et Cave, 2000	Nécessité de relancer le test en fonction pH en fin de test du filtrat	Ajustement pH toutes les 5 min pendant 1 H  Attente atteinte pH 7 au début phase intestinale, parfois long selon Wragg et Cave, 2000		<i>A priori</i> peu de travaux publiés, normalisé en Allemagne		D'autres aliments ont été testés ("petits déjeuners" et sphagettis - Oomen <i>et al.</i> , 2006)	Solutions digestives à préparer la veille	<i>A priori</i> comme RIVM	Nécessité de disposer de fèces fraîches	Etudes conduites par la société TNO		

Tableau 5 : Composition des solutions digestives des tests physiologiques de bioaccessibilité *in vitro* avec analogues gastro-intestinaux (si non précisé, unité en mg/L).

Phase	types de constituants		constituants	PBET	SBET	IVG	DIN	RIVM	RIVM avec nourriture	UBM	FOREHST	SHIME statique	Bilan de masse / recapture du sol					
salivaire	sels		NaCl	so	so	so	1667	298	idem RIVM	idem RIVM sans nourriture	a priori idem RIVM avec nourriture	so	400					
			NaSCN ou KSCN				500	200	idem RIVM									
			Na2SO4				1833											
			NaH2PO4 ou KH2PO4				2000	888	idem RIVM				600					
			Na2PO4					570										
			Na2SO4						570									
			NaHCO3				500											
			KCl				1500	896	idem RIVM				400					
			CaCl2				500						990					
			NaOH					72										
			NAHCO3						1694									
	enzymes		alpha amylase				833	145	290									
	autres constituants		mucine				2500	50	pas de mucine (Gron 2005)			4000						
		urée				333	200	200			1000							
		acide urique				33	15	15										
pH						6,4	6,5+/-0,2	6,8+/-0,2	6,5+/-0,5			5,5						
Nombre de constituants de la solution salivaire				so	so	so	12	10			so	6						
gastrique	acides		HCl	12N	12,1N	np	np	37% (8,3 mL)	idem RIVM	idem RIVM sans nourriture	a priori idem RIVM avec nourriture	dilué (8mL)	7mL/L					
			citrate	500														
			malate	500														
			acide lactique	420µL/L														
			acide acétrique	500 µL/L														
	enzymes		pepsine	1250		1%	1000	1000	2500				6,8 µL	3200				
	sels		NaCl			0,15M	2900	2752	idem RIVM					2000				
			KCl				700	824	idem RIVM									
			Na2HPO4				270	266	idem RIVM									
			CaCl2					400	idem RIVM									
			NH4Cl			1,8	2	306	idem RIVM									
	autres constituants		glycine		30 030													
			glucose					650	idem RIVM									
			acide glucuronique					20	idem RIVM									
			glucoseamine hydrochloride					330	idem RIVM									
			urée					85	idem RIVM									
			mucines					3000 (mais pas de mucine selon Gron,	pas de mucine (Gron 2005)									
			acide galactarique					3000 (selon Gron, 2005)	3000 (selon Gron, 2005)									
		serum albumine bovine					1000	idem										
	pH			1,3 à 4	1,5+/-0,05			1,07+/-0,07	1,30 +/-0,02			1,0+/-0,2	1,3+/-0,5	1,5+/-0,1				
	Nombre de constituants de la solution gastrique				6	2	3	6	13			13		2	3			
intestinale	Bicarbonate de sodium		NaHCO3	1g/2mL (sac)	so	solution saturée	1000	3388	idem RIVM	5606	a priori idem RIVM avec nourriture	12500	0,2M					
			HCL					180 µL 37%	idem RIVM			idem RIVM						
	autres sels		NaCl					7012	idem RIVM			idem RIVM						
			KH2PO4					80	non selon gron, 2005			idem RIVM	idem RIVM					
			KCl				300	564	idem RIVM			idem RIVM						
			MgCl2				200	50	idem RIVM			idem RIVM						
			CaCl2				500	200	idem RIVM			idem RIVM						
	enzymes		pancréatine	20 mg			210	9000	3000			8911	idem RIVM		900			
			trypsine					300										
			lipase						500			1485	400					
	autres constituants		serum albumine bovine						1000			idem RIVM	idem RIVM					
			urée					300	100			idem RIVM	idem RIVM					
	pH			7			5,5	7,3 puis 7,5 (mélange avec sol)	7,8+/-0,2			8,1+/-0,2	7,4+/-0,2	8,1+/-0,2	6,5+/-0,1 puis 6,3+/-0,1			
	Nombre de constituants de la solution intestinale					2	so	2	7			11	10	11		2	1	
biliaire	bile		sels bilaires	70 mg	so					idem RIVM	idem RIVM	a priori idem RIVM	so	so				
			extrait sec de bile			2100	9000	6000	29703									
	sels		NaHCO3					5785	idem RIVM						idem RIVM	a priori idem RIVM	so	so
			NaCl				5260											
			KCl				376											
			CaCl2				220											
	acide		HCl				200 µL 37 %											
	autres constituants		SAB					1800										
			urée					250										
	pH								8,0+/-0,2						8,0+/-0,2	8,0+/-0,2	8,2+/-0,2	
Nombre de constituants de la solution biliaire				1	so	1	1	8	8		so	so						

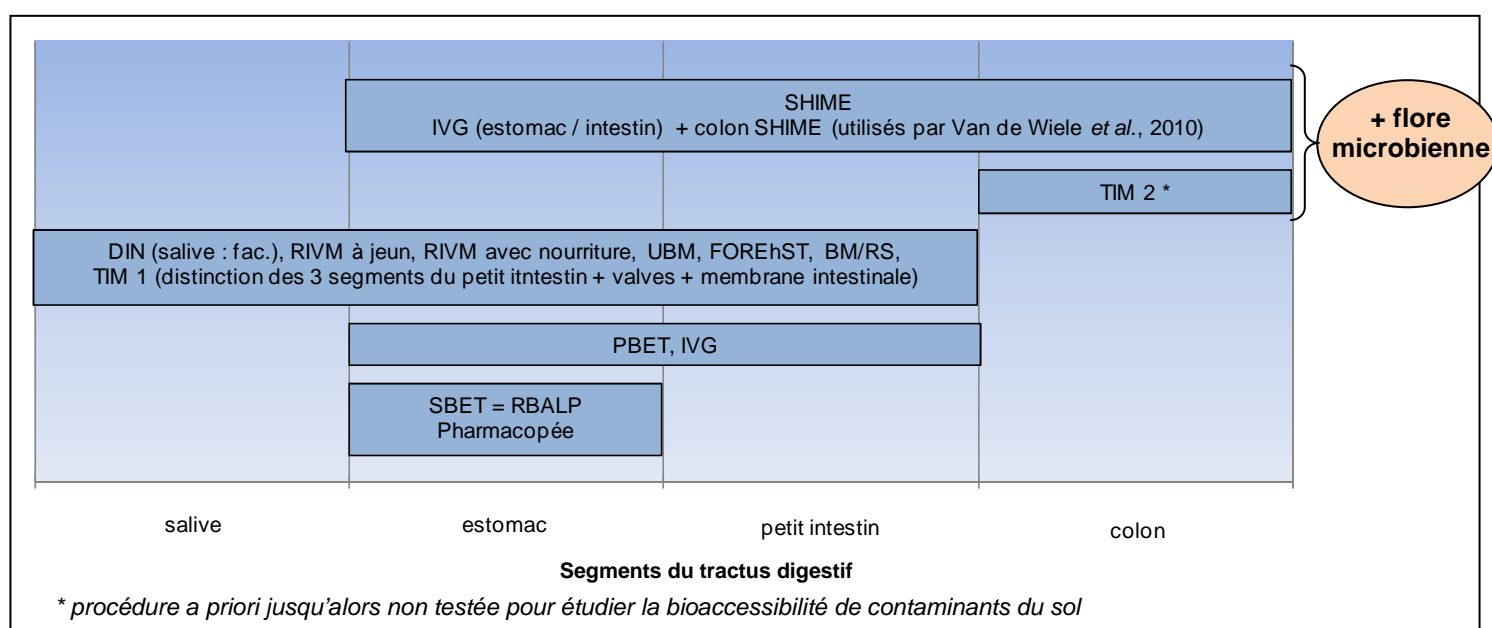
So : sans objet

## ii) Paramètres sensibles des essais

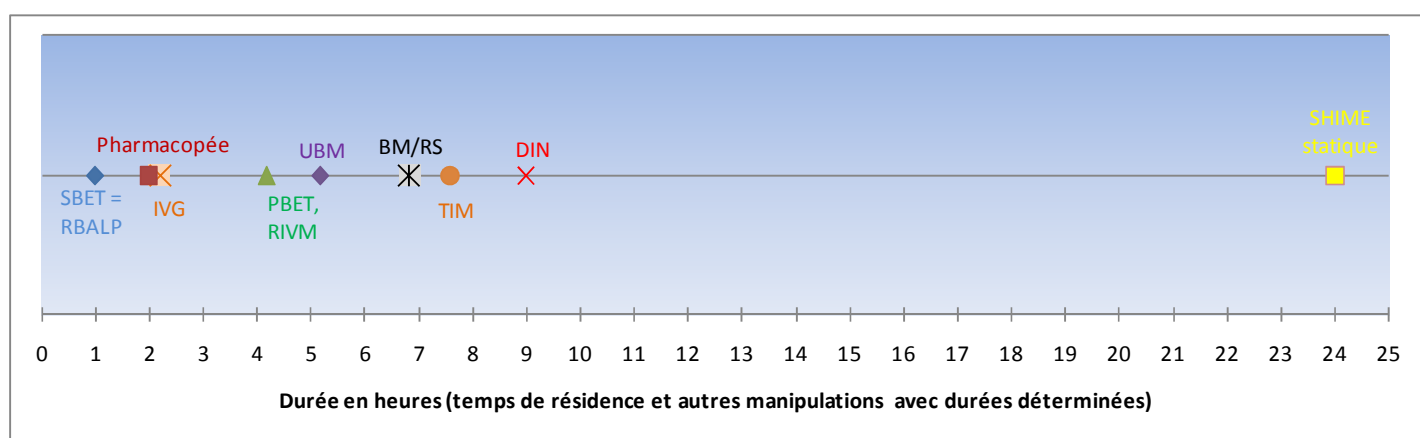
Sont présentées ici les différences existant entre les tests ou entre plusieurs variantes mises en œuvre, et qui peuvent constituer des paramètres sensibles influençant les résultats de bioaccessibilité.

### a. Compartiments physiologiques et temps de résidence

La première différence majeure entre les essais de bioaccessibilité porte sur les compartiments inclus dans chacun des protocoles, conduisant à avoir des tests plus ou moins longs. La Figure 10 illustre, pour chaque test, les compartiments digestifs inclus. La Figure 11 positionne les tests en fonction de leur durée comprenant les temps de résidence dans chaque segment et les durées des autres manipulations (ex : centrifugation).



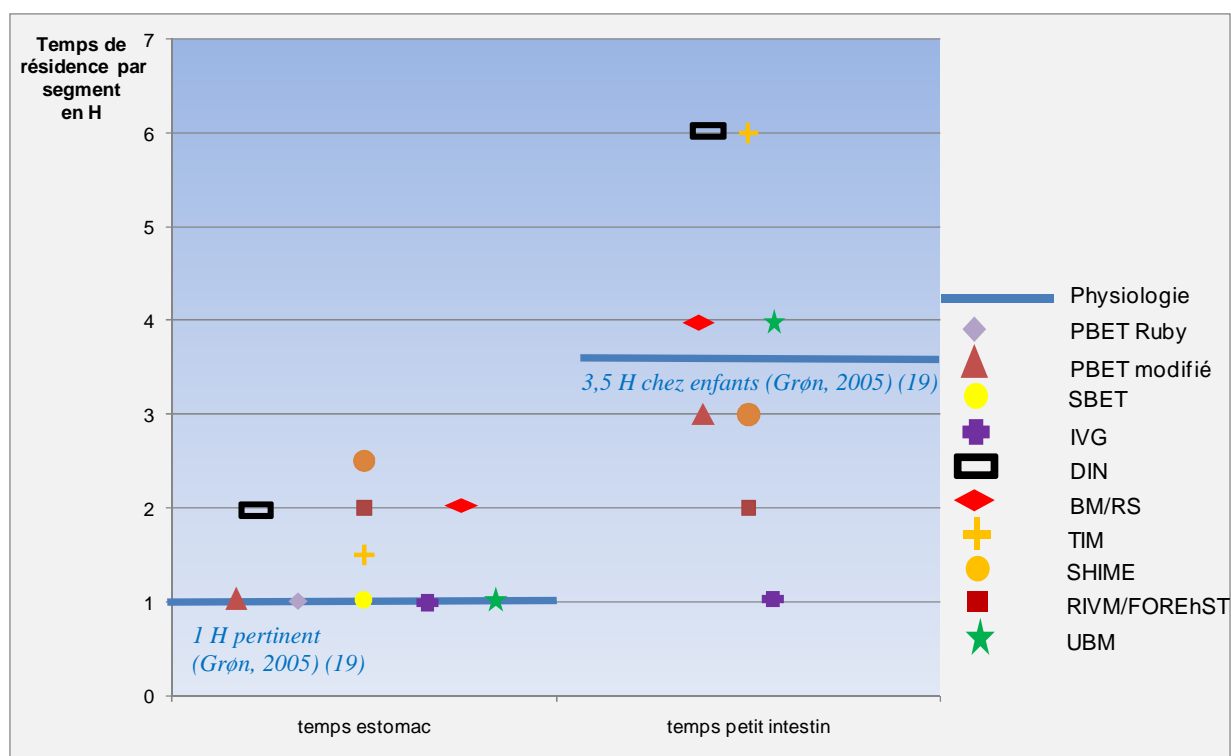
**Figure 10 :** Représentation des segments du tractus digestif inclus dans chaque test de bioaccessibilité.



**Figure 11 :** Représentation des durées des essais de bioaccessibilité comprenant les temps de résidence par segment et les durées déterminées des autres manipulations.

Les compartiments « estomac et intestin grêle » sont les plus impliqués dans la dissolution et l'absorption des contaminants, aussi la plupart des essais miment au moins ces deux segments (19). Les essais IVG et PBET mimant ces deux segments sont conduits sur des durées d'environ 3 et 4 heures respectivement. En revanche, les essais SBET et Pharmacopée, qui ne comportent qu'un seul segment (gastrique), représentent les essais les plus courts (durées respectives d'environ 1 et 2 heures). Les temps de résidence dans les compartiments pour chaque test sont illustrés dans la Figure 12.

Les essais RIVM, UBM, BM/RS, TIM 1 et DIN intègrent en plus une phase salivaire (en général assez courte : quelques minutes) et durent environ 4 à 9 heures.



**Figure 12 : Illustration des temps de résidence (en heures) des segments estomac et intestin grêle par test de bioaccessibilité par rapport aux références physiologiques.**

Des essais plus ou moins longs incluant de plus nombreux segments existent aussi :

- Le modèle SHIME mime plusieurs segments de l'estomac au colon et permet la création d'une flore microbienne représentative de ce dernier, celle-ci pouvant avoir un rôle sur la transformation des molécules avant leur passage de la membrane intestinale. Toutefois l'obtention de cette flore se fait sur une durée de 3 semaines (SHIME dynamique) et l'essai statique est ensuite conduit sur une durée d'environ 24 heures.

L'intérêt de ce test porte effectivement sur l'utilisation d'une flore bactérienne pouvant jouer un rôle non négligeable dans la bioaccessibilité, de part sa capacité de dégradation et transformation des molécules. Van de Wiele *et al.* (55) ont par exemple montré l'impact d'une communauté bactérienne représentative du colon (d'un individu) dans la transformation de l'arsenic avant absorption intestinale. Pour cela, ils ont couplé deux des essais précédemment décrits : la procédure IVG suivie du modèle SHIME. Des métabolites en particulier méthylés et des thio-arsenics ont été observés après mise en œuvre de l'essai sur des sols contaminés en arsenic. Le profil toxicologique de l'arsenic dépend de sa spéciation et est très variable en fonction des formes. Les auteurs préconisent en conclusion d'inclure une activité microbienne représentative du colon humain dans les tests de toxicocinétique destinés à évaluer les risques d'une exposition à l'arsenic par ingestion. Ils attirent également l'attention sur le fait que la variabilité inter-individu de la communauté microbienne est très importante.

A noter toutefois, que les résultats d'une étude internationale (56) ayant utilisé plusieurs essais de bioaccessibilité sur un unique sol de référence NIST 2710, n'ont, dans ce cas, pas montré de différences entre les valeurs de bioaccessibilité de l'arsenic obtenues avec le protocole SHIME mis en œuvre avec ou sans flore bactérienne (56).

- Le modèle TIM-1 simule les valves pyloriques et péristaltiques ainsi que la membrane intestinale, en plus des compartiments estomac et intestin grêle (sur une durée d'environ 8 heures),
- Le modèle TIM-2, simulant le colon, est *a priori* également disponible, mais n'a, semble-t-il, pas encore été utilisé dans le cadre d'études de la bioaccessibilité de contaminants du sol.

Certains auteurs ont par ailleurs testé l'inclusion d'éléments supplémentaires aux protocoles de base. C'est le cas :

- de Rodriguez *et al.* (57) qui ont introduit un gel d'hydroxyde de fer amorphe dans une membrane perméable au cours de la phase intestinale du test IVG (protocole alors appelé méthode IVG-AB), afin de mimer la membrane. Les auteurs souhaitaient ainsi savoir si la méthode IVG-AB permettrait d'obtenir une estimation plus précise de la biodisponibilité (de l'arsenic) que la méthode sans ajout d'adsorbant ne simulant pas l'absorption intestinale. Selon les auteurs, ce protocole IVG-AB n'a pas conduit à améliorer la corrélation entre les résultats de l'essai *in vitro* et ceux d'un essai *in vivo*. Aucun autre travail utilisant cet adsorbant n'est disponible,
- de James *et al.* (58) qui ont testé l'inclusion d'une membrane en C18 dans la phase intestinale d'un test RBALP (suivi d'une phase intestinale) et d'un test IVG (appelé ici IVD) pour mesurer la bioaccessibilité de HAP, la membrane en C18 servant de « piège » pour les molécules organiques.

A titre d'information, cette étude a permis d'augmenter les concentrations bioaccessibles :

- de 0,14 +/-0,069 à 0,67+/- 0,37 µg d'équivalent en benzo[a]pyrène<sup>22</sup>/g dans le test RBALP + phase intestinale,
- de 0,0066+/-0,0041 à 0,29+/-0,16 µg d'équivalent en benzo[a]pyrène<sup>26</sup>/g dans le test IVD.

Elle a également permis d'observer une corrélation significative entre les résultats *in vitro* du test IVD et *in vivo* d'un modèle porc ( $r^2 = 0,45$ ), alors que sans membrane C18, aucune corrélation n'était mise en évidence. Avec le test « RBALP + phase intestinale », aucune corrélation n'est démontrée avec ou sans membrane C18.

Concernant plus spécifiquement le temps de résidence des matrices dans chaque compartiment physiologique, la majorité des essais (PBETs, SBET, IVG, UBM) utilisent un temps de résidence stomacale de 1H, près de 94 % du contenu de l'estomac étant renouvelé lors de cette durée (19).

A titre d'exemple, Drexler et Brattin (59) ont mis en œuvre la procédure RBALP avec plusieurs temps de résidence dans la phase unique stomacale (1H, 2H et 4H) sur 11 matrices pour évaluer la bioaccessibilité du plomb. Le temps de résidence a engendré une variation supérieure à la précision du test (évaluée à 7% par les auteurs) que pour une seule matrice mais, aucune différence significative n'a été observée entre les séries. Le temps de résidence n'est donc pas le paramètre le plus sensible des essais, conduisant les auteurs à adopter une durée d'extraction de 1 H.

---

<sup>22</sup> Huit HAP ont été recherchés mais les résultats sont exprimés en équivalents de benzo[a]pyrène, composé référence à partir duquel des facteurs d'équivalent toxique (FET) ont été déterminés pour les autres composés. Le principe des FET est fondé sur les hypothèses selon lesquelles l'organe cible et l'activité toxique sont identiques pour chaque molécule apparentée et qu'il n'y a pas d'interaction toxicocinétique ni toxicodynamique. Une telle approche autorise l'addition des risques cancérogènes liés à une co-exposition et permet de quantifier le pouvoir cancérogène d'un mélange de substances en fonction du pouvoir cancérogène d'une substance dite de référence, appartenant à la même famille chimique (OMS IPCS, 1998). La table des FET retenue ici est celle du Canadian Council of Ministers of the Environment.

La durée moyenne de résidence dans l'intestin grêle d'un enfant est de 3,5 H en moyenne (19). Les essais UBM, BM/RS, PBETs et SHIME préconisent des durées proches avec 4 H pour les deux premiers et 3 H pour les deux derniers. D'autres tests s'en écartent (DIN avec 6H, RIVM/FOREhST avec 2 H et IVG avec 1 H).

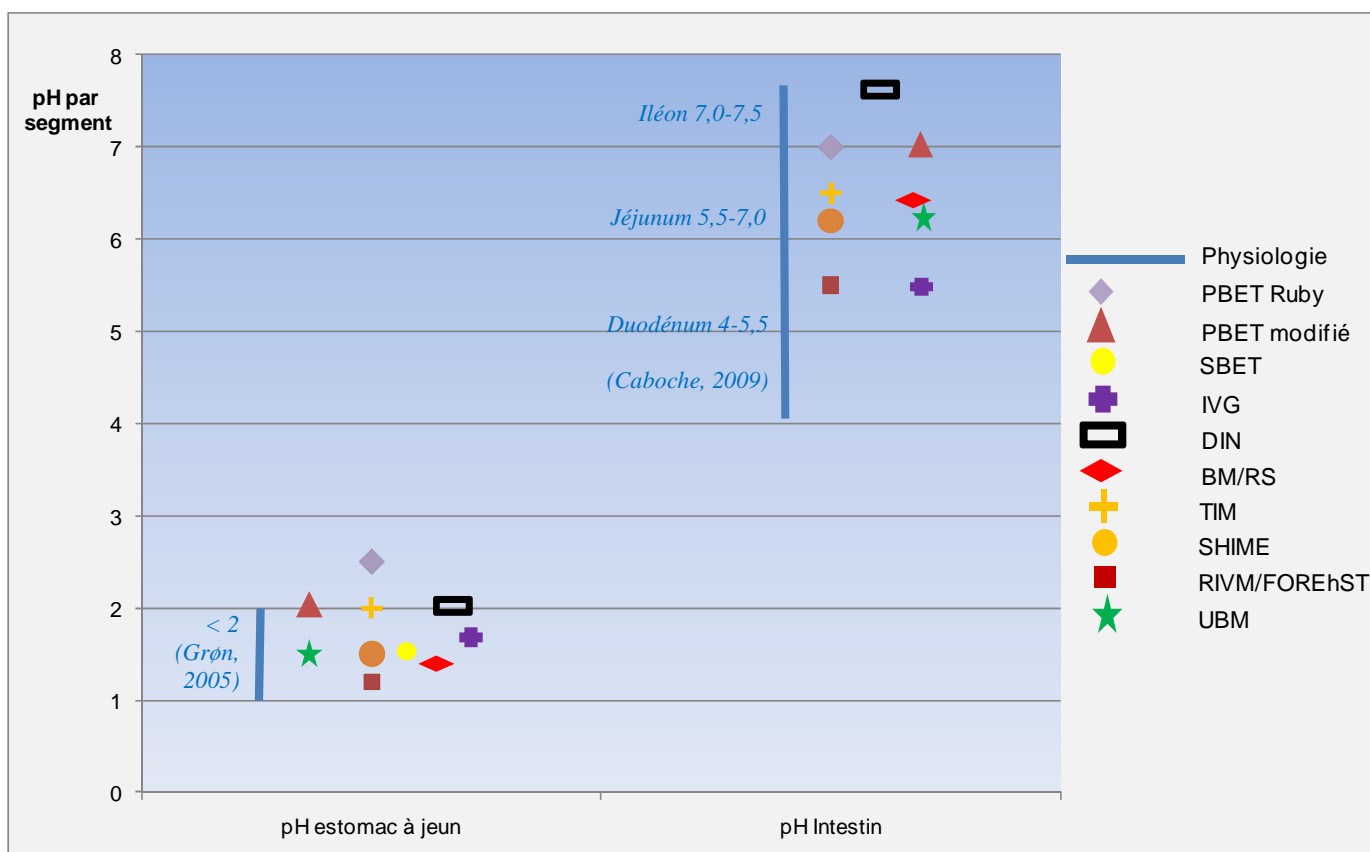
L'inclusion d'un plus grand nombre de compartiments et l'ajustement des temps de résidence ont toujours pour objectif de mieux représenter les conditions physiologiques.

### b. Le pH de chaque compartiment physiologique

La Figure 13 illustre le pH au niveau des segments « estomac » et « intestin grêle » de l'ensemble des essais de bioaccessibilité.

Les pH physiologiques de l'estomac à jeun varient de 1 à 4 mais certains auteurs soulignent la pertinence de se placer à des pH inférieurs à 2 (notamment pour étudier la bioaccessibilité des molécules inorganiques) (19). L'ensemble des essais utilise un pH gastrique compris entre 1 et 2 sauf le PBET initial de Ruby *et al.* (1996) (pH = 2,5). L'impact du pH en particulier gastrique sur les résultats de bioaccessibilité est développé ci-après.

Enfin, le pH de l'intestin grêle varie de 4 à 7,5 du duodénum à l'iléon (18). L'ensemble des essais préconise des pH compris entre 5,5 et 7,5.

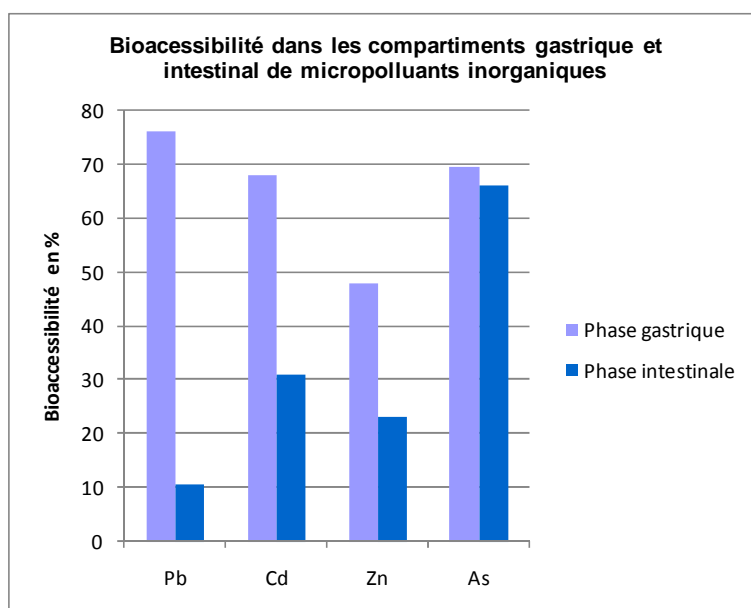


**Figure 13 :** Illustration des pH des segments estomac et intestin grêle par test de bioaccessibilité par rapport aux références physiologiques.

**Le pH (notamment le pH gastrique) est un paramètre majeur pouvant faire varier les résultats de bioaccessibilité entre les compartiments mimés et les essais.**

Le pH est le paramètre qui expliquerait les différences de bioaccessibilité mises en évidence entre les compartiments gastrique et intestinal pour les éléments inorganiques. En effet, quelque soit le test employé, la bioaccessibilité des micropolluants inorganiques, en particulier cationiques tels que le plomb et le cadmium, est plus élevée dans le compartiment gastrique que dans l'intestinal (18)(35)(60). Ceci est expliqué par les différences de pH : pH acide de l'estomac permettant une dissolution de ces éléments, et le pH proche de la neutralité dans l'intestin conduisant à leur précipitation (12).

Les Figure 14, 15 et 16 ainsi que le Tableau 6 illustrent ces observations par des exemples de bioaccessibilités mesurées dans les compartiments gastrique et intestinal.



**Figure 14 :** Illustration de résultats de bioaccessibilité dans les compartiments gastrique et intestinal de micropolluants inorganiques (d'après les résultats de Ellickson *et al.* (60), Roussel *et al.* (35), BARC (56) ).

**Tableau 6 :** Illustration des différences ou similitudes en fonction des éléments des bioaccessibilités entre les phases gastriques et intestinales des essais *in vitro*, y compris pour des formes de référence.

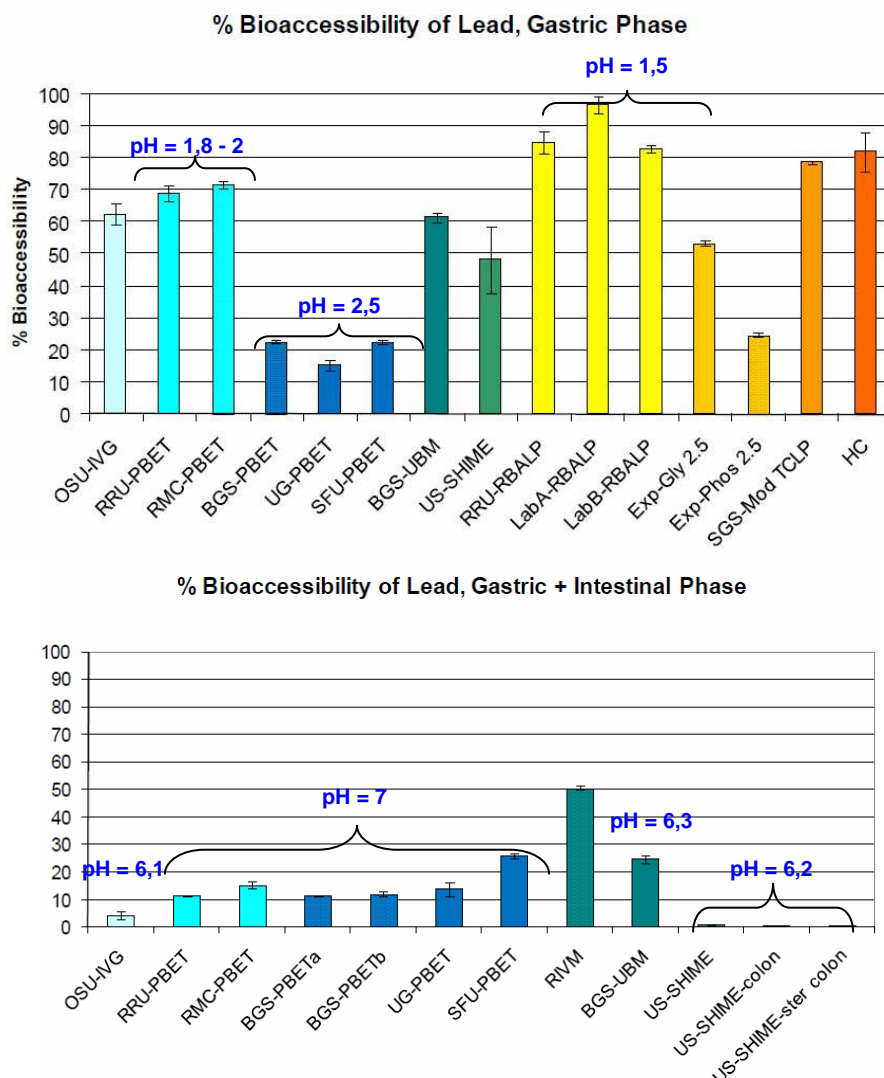
Matrices testées	Eléments	Bioaccessibilités en %		Sources
		Phase gastrique	Phase intestinale	
Sol de référence	Plomb	76,1+/-11 %	10,7+/- 2,3%	Elliskson <i>et al.</i> , 2001 (60)
	Arsenic	69,4+/-8,3 %	65,9+/-5,2 %	
27 sols (médiane des valeurs)	Plomb	65	32	Roussel <i>et al.</i> , 2010 (35)
	Cadmium	68	31	
	Zinc	48	23	
Acétate de plomb*	Plomb (forme cationique)	99+/-2 %	65+/-3 %	Caboche, 2009 (18)
Chlorure de cadmium*	Cadmium (forme cationique)	98+/-4 %	68+/-3 %	
Arséniate de sodium *	Arsenic (forme anionique)	95+/-3 %	92+/-4 %	
Antimoniote de potassium *	Antimoine (forme anionique)	93+/-5 %	90+/-2 %	

\* Formes de référence

Une récente étude (BARC, 2011) a comparé les résultats de bioaccessibilité pour de nombreux éléments inorganiques (24 éléments) obtenus par la mise en œuvre de différents essais *in vitro* (17 essais) par plusieurs laboratoires (14 laboratoires) sur un unique sol de référence commun (sol NIST 2710) (56). Les Figure 15 et Figure 16 illustrent des exemples de la disparité des résultats obtenus pour le plomb et l'arsenic, notamment à cause de pH distincts entre les différents essais, et les différents compartiments mimés :

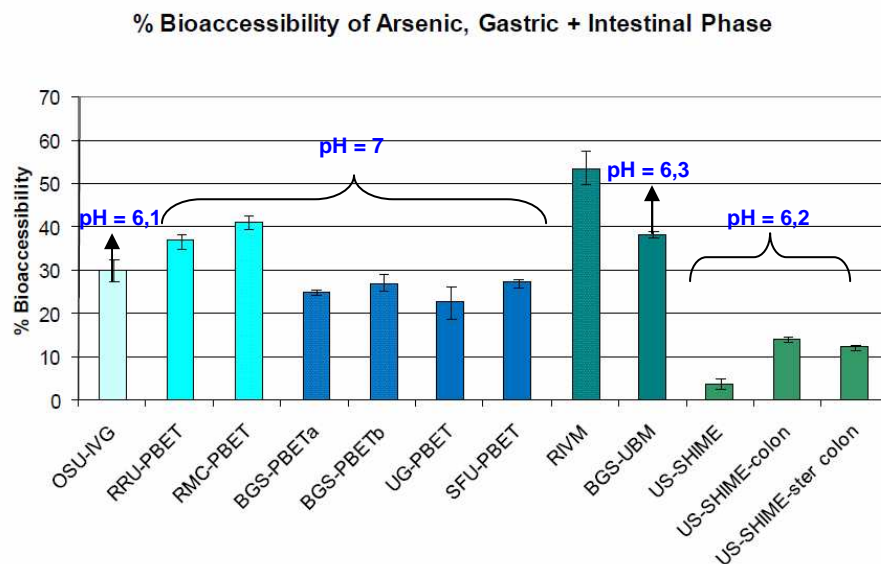
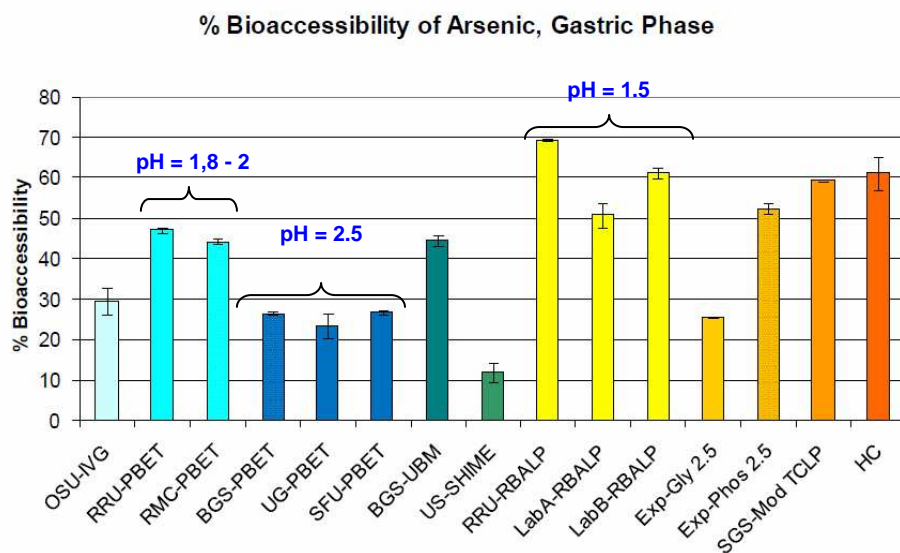
- les résultats des différents essais PBET (5 variantes) confirment que la bioaccessibilité est plus faible lorsque le pH gastrique est plus élevé, soit 2,5 dans les méthodes PBET des équipes BGS / UG et SFU, par rapport aux résultats obtenus avec les essais PBET des équipes RRU et RMC avec des pH gastriques de, respectivement, 2 ou 1,8 ;
- parmi les essais employés, le test RBALP (= SBET) à phase stomacale unique et un pH de 1,5 fournit les valeurs de bioaccessibilité les plus élevées pour les 3 éléments inorganiques cités.

D'après cette étude (56), une corrélation négative significative a été mise en évidence pour l'arsenic, le cadmium, le cuivre et le zinc entre les valeurs de bioaccessibilité et les pH, avec des corrélations plus robustes pour les phases gastriques, par rapport aux tests incluant les phases gastriques et intestinales.



**Figure 15 :** Résultats des essais de bioaccessibilité du plomb dans le sol de référence NIST 2710 obtenus par la mise en œuvre de plusieurs essais *in vitro* par différents laboratoires – (BARC, 2011) (56).





**Figure 16 :** Résultats des essais de bioaccessibilité de l'arsenic dans le sol de référence NIST 2710 obtenus par la mise en œuvre de plusieurs essais *in vitro* par différents laboratoires –(56).

### **c. La composition des solutions digestives**

#### ➤ Les solutions stomacales

De façon générale, l'ensemble des solutions stomacales est à base d'acide chlorhydrique (HCl), à l'instar du suc gastrique physiologique. La pepsine, enzyme hydrolysant les protéines est également présente dans l'ensemble des solutions gastriques des essais, hormis :

- dans celle du SBET utilisant de la glycine (ayant pour objectif d'augmenter la solubilité des métaux par complexation (19)),
- et dans les autres méthodes simples, notamment les tests Exp-Gly, Exp-P, TCLP, HC (cf Figure 15 et Figure 16).

#### ➤ Les solutions intestinales

Toutes les solutions intestinales sont, quant à elles, à base de bicarbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ ) permettant d'augmenter le pH après la phase stomacale et, de pancréatine (sauf dans l'essai BM/RS), extrait lyophilisé du suc pancréatique possédant ainsi les diverses activités enzymatiques de celui-ci. D'autres enzymes ne sont utilisées que dans certains essais (afin d'augmenter selon les auteurs, certaines capacités hydrolytiques (4)):

- la lipase (enzyme pancréatique) est utilisée dans les tests RIVM / UBM / FOREhST,
- la trypsine est introduite dans l'essai DIN.

La composition des solutions digestives est propre à chaque essai, et est plus ou moins complexe.

Les solutions digestives les plus complexes sont celles des essais RIVM, UBM, et FOREhST (cf. Tableau 7). Elles sont reconnues pour être les plus représentatives des conditions physiologiques humaines par rapport aux tests SBET et DIN (19), et par extension, par rapport aux tests PBET, IVG, SHIME, BM/RS, ainsi qu'aux tests physiologiques simplifiés tels que SBET (ou RBALP), Exp-Gly, Exp-P, TCLP et HC.

Les résultats de l'étude BARC (2011), menée sur un sol de référence, indiquent que les essais simples à segment unique, soit les essais SBET (ou RBALP), Exp-Gly, Exp-P, TCLP et HC, fournissent les valeurs de bioaccessibilité les plus élevées par rapport aux autres essais mis en œuvre. Ces tests physiologiques simples sont-ils représentatifs de la réalité ? Ce point sera spécifiquement abordé dans le chapitre IV.2.2.4 relatif à la validation des protocoles *in vitro*.

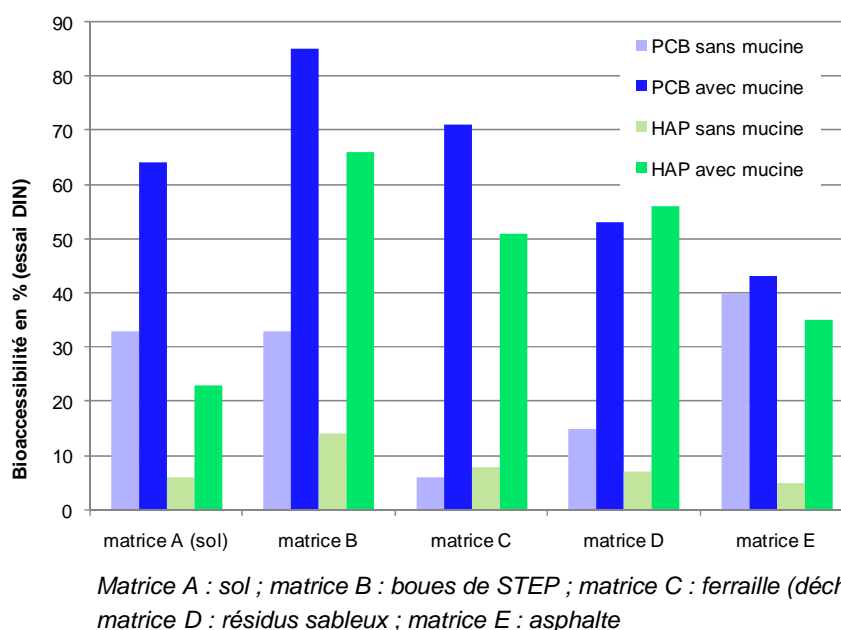
**Tableau 7 : Résumé des constituants composant les solutions digestives des essais de bioaccessibilité.**

Phase	types de constituants	constituants	PBET	SBET	IVG	DIN	RIVM/UBM/FOREhST	SHIME statique	BM:RS	
salivaire	sels	NaCl	so	so	so	x	x	so	x	
		NaSCN ou KSCN				x	x			
		Na2SO4				x				
		NaH2PO4 ou KH2PO4				x	x		x ?	
		Na2PO4					x			
		NaHCO3				x				
		KCl				x	x		x	
		CaCl2				x			x	
		NaOH					x			
	enzymes	alpha amylase				x	x			
	autres constituants	mucine				x	x		x	
urée					x	x		x		
acide urique					x	x				
Nombre de constituants de la solution salivaire			so	so	so	11	10	so	6	
gastrique	acides	HCl	x	x	x	x	x	x	x	
		autres (citrique, malique, lactique, acétique)	x							
	enzymes	pepsine	x		x	x	x	x	x	
	sels	NaCl			x	x	x		x	
		KCl,				x	x			
		Na2HPO4				x	x			
		CaCl2					x			
		NH4Cl					x			
	autres constituants	glycine		x						
		glucose, acide glucuronique, glucoseamine hydrochloride					x			
		urée					x			
		mucines					x			
BSA						x				
Nombre de constituants de la solution gastrique			3	2	3	5	11	2	3	
intestinale	Bicarbonate de sodium	NaHCO3	x	so	x	x	x	x	x	
	autres sels	NaCl					x			
		KH2PO4					x			
		KCl				x	x			
		MgCl2				x	x			
		CaCl2				x	x			
	enzymes	pancréatine	x		x	x	x	x	x	
		trypsine				x				
		lipase					x			
	autres constituants	SAB					x			
		urée					x	x		
Nombre de constituants de la solution intestinale			2	so	2	7	10	2	1	
biliaire	bile	sels biliaires	x	so				so	so	
		extrait sec de bile			x	x	x			
	sels	NaHCO3					x			
		NaCl					x			
		KCl					x			
		CaCl2					x			
		acide	HCl							x
	autres constituants	SAB					x			
		urée					x			
Nombre de constituants de la solution biliaire			1	so	1	1	8	so	so	

Les chercheurs du RIVM ont notamment apporté une attention particulière à la solution biliaire (Cf. ANNEXE 2), celles-ci jouant probablement un rôle majeur dans la mobilisation des contaminants du sol, de part ses propriétés surfactantes et sa capacité à former des micelles. Ceux-ci préconisent d'utiliser des extraits de bile lyophilisée (également employés dans les tests IVG et DIN) plutôt que des sels biliaires (comme c'est le cas dans le PBET). Pour des raisons éthiques, des extraits de bile humaine ne peuvent être employés mais les extraits d'origine porcine ou bovine sont *a priori* similaires et sont ainsi recommandés. Les extraits de bile de poulet sont, à l'inverse, moins proches de ceux d'origine humaine et induiraient des résultats plus irréguliers (4).

Concernant la composition des solutions digestives, il est toutefois difficile d'associer les résultats observés à des différences de constituants et/ou concentrations, car d'autres facteurs significatifs (comme le pH) sont également variables en fonction des essais. Quelques résultats sont néanmoins disponibles sur ce point :

- l'emploi de mucines, protéines émulsifiantes, par Hack et Selenka dans un test proche du DIN, (61) a permis d'augmenter la bioaccessibilité d'un facteur de 4 à 10 pour les HAP étudiés et de 1 à 14 pour les PCB (cf. Figure 17) ;
- des acides organiques (ajoutés dans les essais RIVM / UBM / FOREhST) induiraient, une augmentation de la dissolution des HAP (facteur de 5), ainsi que celle du plomb et du chrome dans le segment intestinal (mais une diminution dans le segment stomacal) (19) ;
- la présence de phosphates influencerait la dissolution des molécules, notamment les substances inorganiques : réduction de la dissolution du plomb (19) et, à l'inverse, augmentation de la bioaccessibilité de l'arsenic (62).

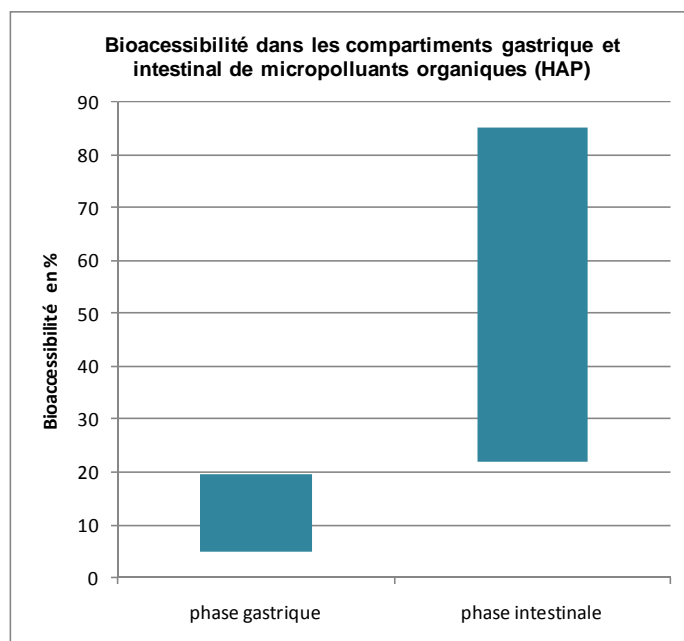


**Figure 17 : Bioaccessibilité de PCB et HAP selon le test DIN en présence ou absence de mucines (61)**

Il faut également souligner que la composition des solutions intestinales a probablement un rôle majeur sur la solubilisation des molécules organiques à tendance lipophile.

En effet, à l'inverse des molécules inorganiques, il semble que la bioaccessibilité des molécules organiques telles que les HAP soit augmentée dans le segment intestinal par rapport au segment gastrique. Par exemple, les HAP sont, selon l'étude de Lu *et al.* (40), plus bioaccessibles dans la phase intestinale que dans la phase gastrique d'un test dérivé du PBET et du RIVM (cf. Figure 18) :

- bioaccessibilité variant de 4,9 à 21,8 % dans la phase gastrique ;
- bioaccessibilité variant de 14,6 à 63,2 % dans la phase intestinale.



**Figure 18 :** Illustration de résultats de bioaccessibilité dans les compartiments gastrique et intestinal de micropolluants organiques : HAP (d'après les résultats de Lu *et al.* (40)).

De même, Oomen *et al.* (63) ont étudié les effets des composants des liquides digestifs sur la bioaccessibilité des PCBs et du lindane à partir d'un sol de référence contaminé (OCDE). Plusieurs facteurs ont été étudiés dont la quantité de bile et la quantité de protéines. Les résultats montrent que les polluants testés sont largement sorbés aux micelles de sels biliaires (20-25% des polluants totaux) bien que la quantité de bile (0,9 g/L) soit minoritaire par rapport à la concentration en protéines (3,7 g/L) et à la concentration du milieu OCDE (15,4 g/L). Les auteurs concluent que les micelles de sels biliaires jouent donc un rôle important dans la mobilisation des composés organiques hydrophobes présents dans une matrice, influençant ainsi leur bioaccessibilité.

#### **d. Le ratio Liquide/Solide (L/S)**

**Le rapport liquide/solide entre les solutions digestives et la quantité de sol introduit semble également être un facteur pouvant influencer les résultats de bioaccessibilité.**

Les premiers auteurs à avoir développé un essai de bioaccessibilité (PBET), ont montré que des ratios L/S compris en 5/1 et 25/1 entraînaient des sous-estimations de la bioaccessibilité (64)(65)(66). D'autres auteurs (67) ont ensuite observé que des variations de ratios L/S comprises entre 100/1 à 5 000/1 n'affectaient en revanche que très peu la bioaccessibilité et que ces ratios couvraient les conditions rencontrées physiologiquement.

Les ratios physiologiques ont par ailleurs été déterminés par Oomen *et al.* (13) comme étant compris, pour un enfant, entre :

- 90/1 (9 mL de volume gastrique, 100 mg/jour de sol ingérés),
- et 1125/1 (les 100 mg/jour étant considérés comme ingérés sur une durée maximale de 12H soit une ingestion de 8 mg/heure).

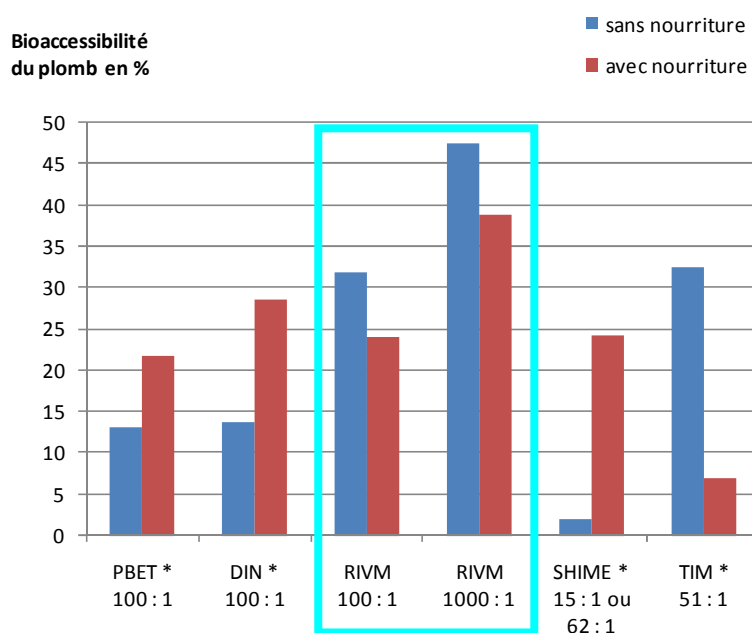
Les auteurs précisent que le ratio est, en réalité, probablement encore plus élevé du fait du renouvellement régulier de la solution gastrique.

Le ratio 100/1 est le plus fréquemment utilisé. A noter toutefois que, dans les essais PBET, le ratio 100/1 est atteint dès le premier segment étudié et est maintenu tout au long du test (lors de prélèvement pour analyses, des quantités identiques de solutions digestives sont ajoutées), tandis que dans les autres essais ce ratio correspond au ratio final (après ajout de l'ensemble des solutions digestives). Il est donc beaucoup plus faible lors des premières phases (ex : il est de 15/1 et 37,5/1 dans les phases salivaire et gastrique des essais RIVM /UBM).

Seuls les tests IVG et BM/RS emploient des rapports initiaux plus élevés de, respectivement, 150/1, et 4160/1. Les chercheurs du RIVM ont également appliqué leur essai avec un ratio de 1000/1 (pour cela introduction de quantités plus faibles de sol, soit 0,06 ou 0,04 g au lieu de 0,6 ou 0,4 g pour un volume de solutions digestives de près de 60 mL).

Plusieurs résultats sont disponibles :

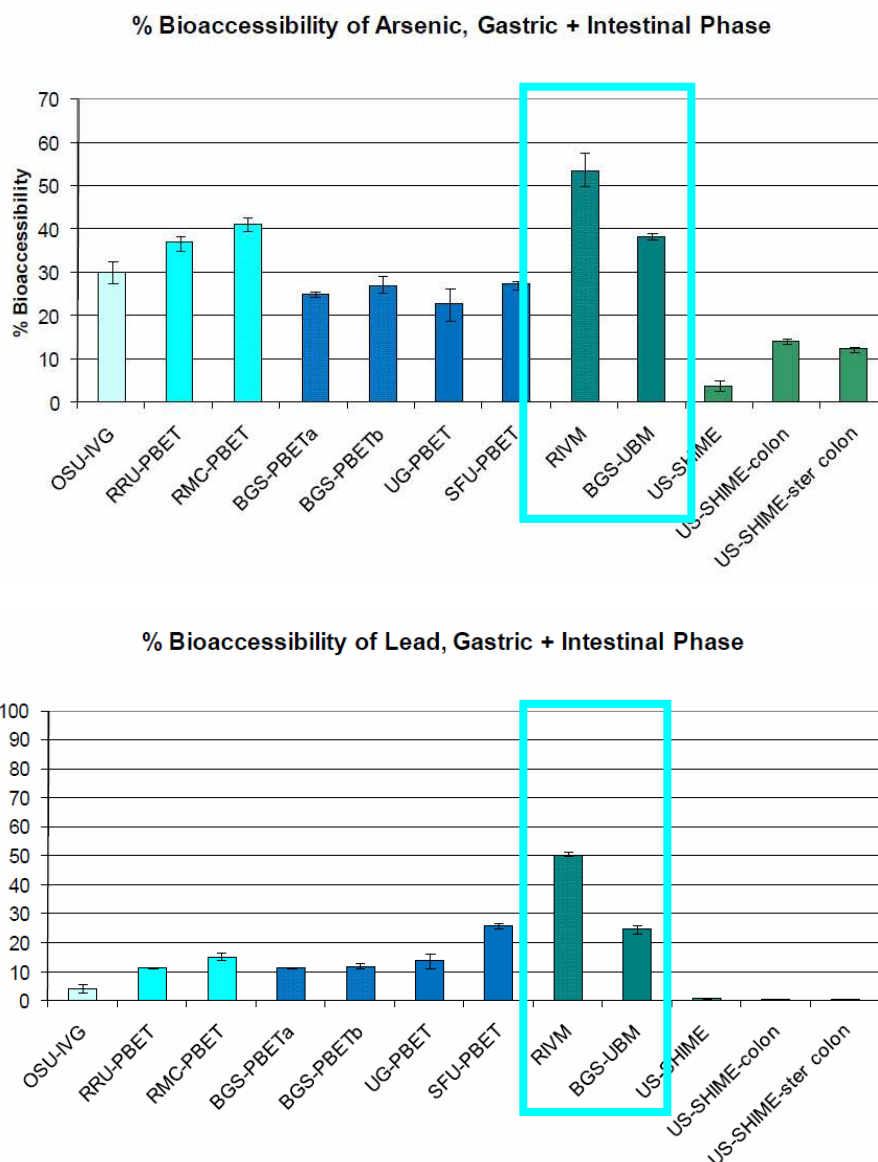
- Oomen *et al.* (13) indiquent que les résultats obtenus n'ont, en général, pas montré de différences significatives entre l'utilisation d'un ratio de 1000/1 (0,06 ou 0,04 g de sol) et un ratio de 100/1 (0,6 ou 0,4 g de sol) pour déterminer la bioaccessibilité du plomb avec le test RIVM. Ils précisent que l'utilisation de quantités plus faibles de sols (0,06 ou 0,04 g) entraînent, dans certains cas, moins de variations du pH dans la phase gastrique que lorsque les quantités de sols sont plus élevées (0,6 ou 0,4 g) conduisant à devoir ajuster le pH. Travailler avec de plus faibles quantités comporte toutefois des inconvénients, en particulier si les sols étudiés sont très hétérogènes et si les teneurs totales, ou bioaccessibles, sont très faibles risquant d'être en deçà des limites de quantification des méthodes de mesures.
- Au contraire les résultats obtenus par Van de Wiele *et al.*, (68) ayant mis en œuvre 5 tests de bioaccessibilité (avec et sans aliments), dont le test RIVM avec les deux ratios classiquement employés, tendent à montrer que la bioaccessibilité du plomb est plus élevée avec le ratio le plus élevé (cf. Figure 19).



\* différences entre l'état à jeun et l'état nourri statistiquement significatives.

**Figure 19 : Résultats de bioaccessibilité du plomb dans un sol selon 5 tests *in vitro* en présence et absence d'aliments (d'après Van de Wiele *et al.* (68)).**

- Les résultats de l'étude du BARC (56) confirment qu'avec un ratio plus élevé, la bioaccessibilité de certains éléments traces métalliques est plus élevée (cf. Figure 20). En effet, la seule différence entre les essais UBM et RIVM mis en œuvre dans le cadre de cette étude concernait le ratio L/S respectivement de 100/1 et 1000/1. Or, pour les trois éléments plomb, arsenic et cadmium, les résultats de bioaccessibilité ont été supérieurs pour l'essai RIVM (dans la phase gastro-intestinale, phase gastrique non analysée dans l'essai RIVM)



**Figure 20 : Résultats des essais de bioaccessibilité (dans la phase gastro-intestinale) de l'arsenic et du plomb dans le sol de référence NIST 2710 obtenus par la mise en œuvre de plusieurs essais *in vitro* par différents laboratoires – (BARC, 2011) (56).**

- Les travaux récents de Wragg *et al.* (69) confirment aussi que l'emploi d'un ratio L/S plus élevé de 1000/1 peut s'avérer utile. En effet dans le cadre de cette étude interlaboratoire ayant mis en œuvre le test UBM, l'emploi du ratio 1000/1 pour mesurer la bioaccessibilité de l'arsenic a permis d'améliorer, par rapport à l'essai conduit avec le ratio L/S de 100/1 :
  - la corrélation avec les essais *in vivo* (cf chapitre IV.2.2.4),
  - la reproductibilité inter-laboratoires<sup>23</sup> des mesures. Ceci pourrait être lié au fait qu'avec les plus faibles quantités de sol, comme l'évoquaient déjà Oomen *et al.* (13), les variations du pH gastrique sont moindres pendant la durée de l'essai, ce qui conduit à une moindre variabilité des résultats entre les laboratoires ;
  - les problèmes liés à la saturation des sites de fixation de l'arsenic,
  - les effets matrices négatifs (par dissolution plus importante des espèces chimiques qui pourraient nuire à l'analyse)

<sup>23</sup> A noter cependant que seuls 2 laboratoires ont conduit le test avec un ratio de 1000/1 pour évaluer la bioaccessibilité de l'arsenic, contre 7 laboratoires avec le ratio 100/1 ce qui pourrait également conduire à améliorer la reproductibilité. Le poids statistique d'une étude avec un nombre plus restreint de participants est néanmoins plus limité.

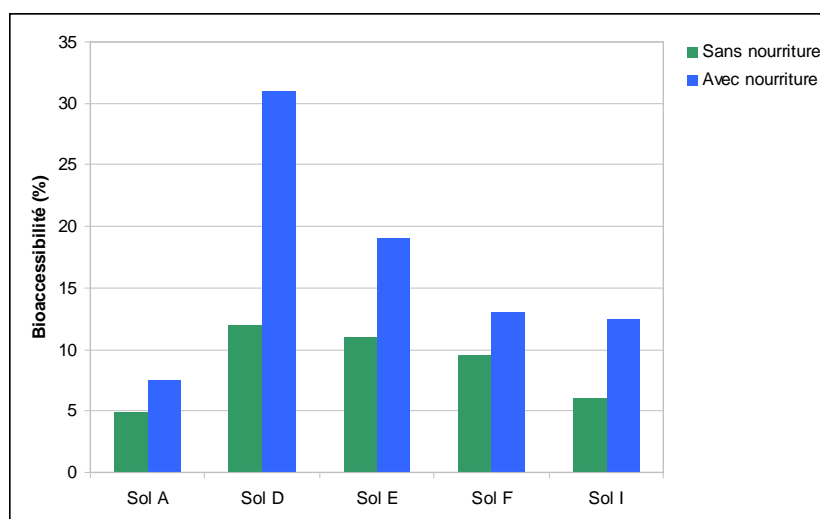
### e. La présence d'aliments

#### Une autre différence majeure entre les essais de bioaccessibilité concerne l'introduction au cours du test d'aliments.

Les premiers essais développés pour les éléments inorganiques intégraient des conditions à jeun. Ces conditions sont considérées comme les plus conservatrices pour étudier la bioaccessibilité des éléments inorganiques, car donnant lieu à des pH plus faibles que ceux associés à un état nourri (52), et permettant une meilleure solubilisation de la matrice et des contaminants.

A l'inverse, concernant les éléments organiques, plusieurs études ont montré que la présence d'aliments augmente leur bioaccessibilité. A titre d'exemple, Hack et Selenka (61) ont inclus du lait lyophilisé dans leur essai *in vitro* ce qui a augmenté la mobilisation des HAP de 5 à 40 %, et celle des PCB de 40 à 85 %. De même, la bioaccessibilité de dioxines/furanes (comprise entre 3 et 39%) peut être augmentée d'un facteur de 2 à 4 en présence de lait (4). La Figure 21 illustre un troisième exemple avec une augmentation de la bioaccessibilité du diesel dans un sol en présence d'aliments montrée par Holman *et al.* (70).

Ceci est dû à une meilleure dissolution des composés organiques grâce aux aliments et aux sels biliaires. En effet, les aliments contiennent des graisses qui peuvent faciliter la dissolution des contaminants organiques hydrophobes dans la solution aqueuse (sous forme d'émulsion) et, lorsque la nourriture est présente dans le tractus gastro-intestinal, la quantité de sels biliaires augmente, et agit comme un surfactant, en formant des micelles biliaires avec les contaminants organiques (52)(61)(70).



**Figure 21 : Variation de la bioaccessibilité du diesel en fonction de la présence d'aliment (d'après Holman *et al.* (70))**

Certains essais ont donc été développés en prévoyant l'introduction d'aliments. C'est le cas des essais DIN, IVG, RIVM, FOREhST :

- les deux premiers ne prévoient pas de changements spécifiques de protocole lorsque des aliments sont introduits,
- le test RIVM, et par extension FOREhST, a, développé une version spécifique avec introduction de nourriture dans laquelle sont prévues, par rapport à la version représentant les conditions à jeun, des augmentations de :
  - pH gastrique (à 2-2,5 contre 1,2),
  - de concentrations en enzymes (pancréatine et lipase) des solutions digestives,
  - de concentrations en bile (près de 30 000 mg/L contre 6 000 mg/L).

De telles augmentations sont effectivement observées d'un point de vue physiologique (ex : après alimentation, le pH gastrique peut s'élever à des valeurs de 4 - 5 pour rediminuer à, en moyenne, une valeur de 2 une heure après (19))



A noter que ces deux derniers essais (RIVM avec nourriture et FOREhST) ont été développés pour étudier la bioaccessibilité des molécules organiques. Le test UBM n'a *a priori* à ce jour pas été testé avec introduction de nourriture.

Certains essais, au départ développés pour être réalisés en conditions à jeun ont parfois fait l'objet d'études avec introduction d'aliments (ex : PBET ; études de Van de Wiele et al (68) et Medlin, (1997), reportée par Drexler et Brattin (59)).

A titre d'information, les aliments introduits dans ces essais sont indiqués dans le Tableau 8. Ce sont par exemple de la poudre de lait (essai DIN) ou des préparations à base d'aliments pour bébé et d'huile (ex : RIVM).

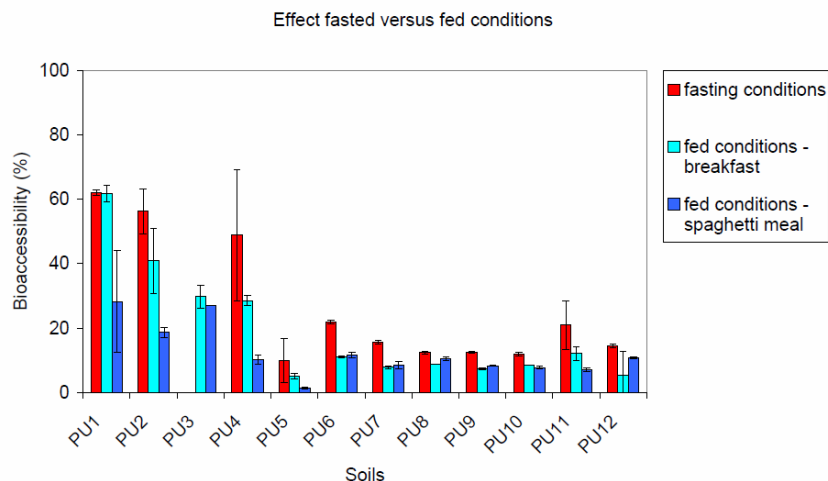
**Tableau 8 : Aliments utilisés dans certains essais de bioaccessibilité.**

IVG	Véhicule de dosage correspondant à un aliment humide, utilisé pour exposer les organismes des essais <i>in vivo</i> à un sol contaminé, dans l'essai IVG (62)(57).
DIN	Poudre de lait entier <i>Selon la norme DIN, le lait entier est considéré comme représentatif de l'alimentation humaine riche en graisses et protéines et, peut ainsi simuler l'effet des aliments sur la mobilisation des contaminants dans le tractus digestif des bébés et enfants. Il répond de plus aux exigences d'un matériel standardisé, est disponible commercialement et est de qualité suffisamment homogène</i>
RIVM avec nourriture	Nourriture pour bébé (19), de marque Nutricia Olvarit® enrichie par une huile végétale (52) ou encore des spaghettis ou un petit déjeuner (détails non indiqués) selon Hagens <i>et al.</i> (54)
FOREhST	Mixture d'avoine séchée et bouillie de riz pour bébé enrichie en huile de tournesol dans l'essai FOREhST (52)
TIM	Lait (pas de détail plus précis)

Selon les éléments, les essais et les sols étudiés, des augmentations ou diminutions plus ou moins marquées des résultats de bioaccessibilité sont observées en présence d'aliment par rapport à une expérimentation représentant l'état à jeun. Par ailleurs, au-delà de l'absence ou de la présence d'aliments, il apparaît pour certains sols que la nature des aliments introduits serait en mesure de modifier les résultats obtenus. En effet, selon Ng *et al.* (4), le choix et la quantité d'aliments ajoutés dans les tests *in vitro* peuvent avoir un effet significatif sur la mesure de bioaccessibilité, en fonction du contenu en matières grasses et protéines de l'aliment ajouté. Les auteurs n'illustrent toutefois pas cette observation de données précises. *A priori*, seul le RIVM (13) a mis en œuvre un même essai en utilisant différents aliments : spaghettis et « petit déjeuner ». Les résultats sont variables<sup>24</sup> (Cf. Figure 22) :

- pour certains sols, la bioaccessibilité du plomb semble proche pour les essais conduits avec les deux types d'aliments (PU6 à PU10). A noter qu'il s'agit des plus faibles valeurs de bioaccessibilité ;
- pour d'autres (ex : PU1, PU2 et PU3), et notamment pour les valeurs de bioaccessibilité plus élevées, des différences plus marquées sont observées.

<sup>24</sup> Remarque : les auteurs ne traitent pas les résultats obtenus en fonction de ces deux types d'aliments mais comparent simplement les résultats entre les essais à jeun et les essais avec nourriture.



**Figure 22 :** Résultats de bioaccessibilité du plomb de sols contaminés obtenus par la mise en œuvre du test RIVM en conditions à jeun ou avec introduction de deux types de nourriture (petit déjeuner ou spaghetti).

#### f. Autres paramètres sensibles

D'autres caractéristiques sont similaires, ou au contraire, varient entre les essais. Cela concerne :

- **la température :** la majorité des essais étudiés ici est conduite à une température physiologique de 37°C. L'activité des enzymes et les caractéristiques physico-chimiques des molécules, dont la solubilité, sont en effet dépendantes de la température (71).

Au cours de l'étude du BARC de 2011, quelques méthodes simples sans mise en conditions physiologiques à 37°C (TCLP) ont été étudiées, et ont parfois fourni des valeurs comparables à des tests physiologiques simples (notamment au test SBET). Les valeurs de bioaccessibilité des éléments plomb, cadmium et arsenic gastriques étaient, par ailleurs, plus élevées que celles des autres essais mis en œuvre.

Quelques auteurs ont testé l'impact de la température sur les résultats de bioaccessibilité :

- Drexler et Brattin (59) ont mis en œuvre la procédure RBALP (=SBET) à 37°C et 20°C pour évaluer la bioaccessibilité du plomb dans 17 matrices. Bien que les résultats semblent en partie dépendants de la température, une différence de plus de 7% (correspondant à la précision de la méthode calculée par les auteurs) n'a été mise en évidence que pour 6 échantillons avec, dans certains cas, une bioaccessibilité plus élevée à 37°C et dans d'autres cas, une bioaccessibilité plus faible. Des données de biodisponibilités *in vivo* étant disponibles pour uniquement 2 matrices parmi les 17 testées *in vitro*, les auteurs n'ont pu déterminer quelle température fournissait les valeurs les plus proches de celles obtenues dans le modèle animal. Ils préconisent d'utiliser la température de 37°C pour être cohérent avec les précédentes études *in vitro* et conserver une certaine « simulation physiologique ».
- De même, Barnett et Turner (72) ont mis en œuvre une procédure à 37°C et à température ambiante pour évaluer la bioaccessibilité du mercure dans 5 matrices. Aucune différence statistiquement significative n'a été mise en évidence.

- **le mode d'agitation :** tous les essais sont effectivement conduits sous agitation afin de mimer le péristaltisme physiologique permettant le brassage et la progression des aliments dans le tube digestif. Différents modes d'agitation sont cependant employés, à des vitesses variables. Oomen *et al.* (71) indiquent que l'agitation par rotation *end over end* (utilisée dans les essais SBET, RIVM, UBM, FOREhST) serait plus efficace et plus reproductible que les modes d'agitation horizontale (par pale, agitateur magnétique ou plateforme agitée) employés dans les protocoles DIN, IVG, PBET modifié, SHIME. Cela permettrait également d'éviter d'éventuelles contaminations liées aux pâles ou agitateurs magnétiques (Drexler et Brattin (59))

A noter que :

- selon les équipes mettant en œuvre les essais, les modes d'agitation préconisés dans les protocoles initiaux ne sont pas forcément employés (ex : versions de l'essai PBET utilisé par les équipes dans le cadre de l'étude BARC, 2011 ; cf. ANNEXE 3)
- les modes d'agitation utilisés peuvent également dépendre de la verrerie employée et du matériel disponible.

- **les conditions aérobies ou anaérobies** : certains essais (PBET, IVG, SHIME, DIN<sup>25</sup>) miment des conditions anaérobies entraînant des difficultés et coûts expérimentaux plus élevés (nécessité de disposer de source en gaz inerte : argon ou nitrogène). Les autres essais (RIVM, UBM, SBET) se déroulent en condition aérobie.

A ce jour, aucun travail n'a mis en évidence l'influence de l'utilisation des conditions anaérobies ou aérobies sur les résultats des essais de bioaccessibilité. Cependant ces conditions gouvernent les réactions d'oxydoréduction et Grøn (19) souligne qu'il serait pertinent de mimer des conditions aérobies puis anaérobies dans l'estomac puis l'intestin respectivement. Aucun test ne prévoit à ce jour ce changement de conditions.

- **la préparation des échantillons de sol** : le sol avant de subir les essais de bioaccessibilité est en général séché, tamisé (ou élimination de particules de taille supérieure à la valeur souhaitée) et homogénéisé. Le séchage se déroule à température ambiante ou à des températures limitées (< 40-50°C), en particulier pour les essais ayant étudié les molécules inorganiques.

La plupart des essais (PBET, IVG, UBM) utilisent les particules de sol inférieures à 250 µm pour étudier la bioaccessibilité, ceci pour plusieurs raisons :

- les particules < 250 µm représentent les particules adhérant majoritairement aux mains des enfants (18)(57)(73). A noter que certains auteurs indiquent que, dans ce cas, l'ingestion directe de petites quantités de sol n'est pas prise en compte (19),
- en général, les petites particules ayant des taux en argile et en matières organiques les plus élevés présentent les concentrations en métaux et molécules organiques adsorbables telles que les HAP les plus élevées (19),
- les cinétiques de dissolution sont plus rapides avec des petites particules ayant des surfaces spécifiques plus importantes (19).

Dans la norme DIN, les particules de sol ne doivent pas excéder 2 mm mais ce sont les particules inférieures à 1 mm qui sont en général testées. Le RIVM utilise également les particules de taille inférieure à 1 mm (19).

Laird *et al.* (74) ont quant à eux, mis en œuvre l'essai SHIME sur des particules de sol de taille inférieure à 38 µm, celles-ci représentant les plus petites particules pouvant être obtenues par séchage / tamisage.

Enfin, le test BM/RS a été conduit sur des particules < 125 µm ou < 74 µm (pour un sol de référence) (75).

A noter que des variations de résultats de bioaccessibilité en fonction de la granulométrie du sol introduit ont été observées.

De manière générale, les particules fines entraînent une biodisponibilité plus importante que des particules plus grosses d'un même sol (4). En effet, les particules fines ont un ratio surface/volume plus important et de ce fait sont plus facilement solubilisées.

Les travaux de Ruby *et al.* (76), concernant les cinétiques de dissolution du plomb contenu dans des sols contaminés, ont montré, que la biodisponibilité augmente lorsque la taille des particules diminue.

---

<sup>25</sup> Pour l'essai DIN, la norme prévoit de se placer en anaérobiose à « des fins spécifiques ».

Smith *et al.* (39) ont utilisé le test SBET (Ruby *et al.* 1993, 1996) pour évaluer la variabilité des valeurs de bioaccessibilité en fonction de la taille des particules de sols de 4 sites contaminés historiquement. Les valeurs moyennes de bioaccessibilité augmentent de 25 à 42 % pour les particules <250 µm et <10 µm respectivement. Ainsi, il est nécessaire de tenir compte lors de l'évaluation du risque de la présence de particules très fines dans le matériel ingéré telles que des poussières domestiques.

Dans les études de Rasmussen (77), les différences de bioaccessibilité entre les poussières domestiques et les particules de sol ont notamment été attribuées à la teneur en carbone organique. Dans ce cas, une corrélation significative et positive a été établie entre la fraction bioaccessible des métaux et le taux de matière organique de la matrice considérée, plus élevé dans les poussières intérieures (20-34 %) que les sols extérieurs adjacents aux habitations (4%)(1).

De même, concernant les HAP, un enrichissement de la concentration totale en HAP, associé à un taux de matière organique plus élevé, est constaté dans les particules les plus fines des sols superficiels (< 45µm). La bioaccessibilité des HAP dans les fractions les plus fines apparaît inférieure à celle des fractions plus grossières (< 4mm), vraisemblablement dû à une plus forte concentration en matière organique dans les particules fines des sols superficiels (46).

L'influence de la taille des particules a également été soulignée par Girouard et Zagury (78) lors d'essais sur des sols contaminés par de l'arséniate de cuivre chromé, un pesticide du bois très utilisé (test IVG). La bioaccessibilité de l'arsenic a été étudiée dans les fractions < 90 et < 250 µm. Pour deux sols sur trois, la bioaccessibilité dans la fraction < 90 µm est plus élevée que dans la fraction < 250 µm. Au contraire, la bioaccessibilité du mercure semble diminuer lorsque la proportion de particules fines augmente (79).

- **la conduite du test et le type de verrerie employé**

- Concernant la conduite du test, les essais RIVM, UBM, et *a priori* FOREhST, sont menés dans des tubes à centrifuger (volume d'environ 100 mL) :
  - pouvant, d'une part, être centrifugés directement contrairement aux essais PBET de Ruby *et al.* (1996), IVG et SHIME pour lesquels des prélèvements des solutions digestives sont réalisés puis centrifugés,
  - permettant, d'autre part, d'utiliser des centrifugeuses plus petites (moins d'encombrement), *a priori* moins onéreuses et pouvant accueillir un plus grand nombre de récipients que les centrifugeuses destinées à la verrerie de plus grand volume (comme celle utilisée dans l'essai DIN : 500 mL). Cette remarque est également valable pour les dispositifs d'agitation par rotation.

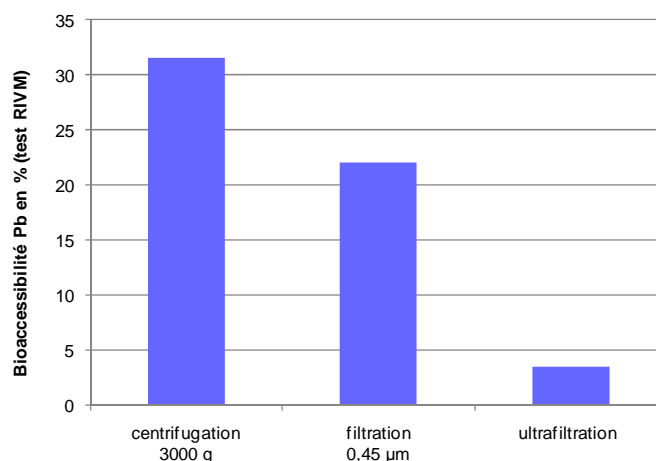
Les essais SBET et le PBET modifié par Drexler ne préconisent qu'une filtration à 0,45 µm et pas de centrifugation. La centrifugation est toutefois classiquement employée en laboratoire pour améliorer la décantation notamment.

Van de Wiele *et al.* (68) ont montré les différences de bioaccessibilité du plomb avec le test RIVM (avec nourriture) pour lequel trois types de séparation ont été testés : centrifugation 3000 g, microfiltration 0,45 µm et ultrafiltration 5 kDa<sup>26</sup>. Les résultats sont, respectivement, de 31,5 %, 22 % et 3,5 % (cf. Figure 23). La centrifugation semble être le mode de séparation fournissant les valeurs les plus sécuritaires en termes de bioaccessibilité. Elle est appliquée dans les essais PBET initial de Ruby *et al.* (1996), IVG, DIN, SHIME RIVM/UBM, FOREhST.

- Concernant le type de verrerie, les essais RIVM, UBM et *a priori* FOREhST, sont simples à réaliser. D'autres essais utilisent, en revanche, des appareillages très complexes (TIM, SBET) ou des protocoles sophistiqués qui sont longs à mettre en œuvre (SHIME), augmentant le coût global du test.

---

<sup>26</sup> kDa = kilo Dalton



**Figure 23 :** Bioaccessibilité du plomb dans un sol selon le test RIVM au cours duquel trois modes de traitement (centrifugation, filtration, ultrafiltration) des échantillons obtenus en fin de phase intestinale ont été mis en œuvre (D'après Van de Wiele *et al.* (68)).

#### IV.2.2.4 Validation des protocoles

Les essais *in vitro* de bioaccessibilité ont été développés afin de fournir une mesure de substitution de la biodisponibilité plus rapide et plus économique que les modèles animaux (64). Toutefois, afin de valider l'utilisation de tests *in vitro* comme mesure de « substitution » de la biodisponibilité des contaminants, une comparaison entre les essais *in vitro* et *in vivo* doit être établie afin de connaître s'il existe ou non des corrélations significatives entre ces deux types d'essais.

Il est également important de connaître la répétabilité et la reproductibilité d'un protocole afin de valider son utilisation sans variation liée à l'utilisateur ou aux conditions de laboratoire.

##### i) Généralités

En général, les auteurs développant les essais de bioaccessibilité se sont attachés à mettre en évidence des corrélations linéaires statistiquement significatives entre les résultats de leurs tests *in vitro* et ceux des tests *in vivo*. La recherche d'une corrélation *in vivo* / *in vitro* est basée sur l'hypothèse que la bioaccessibilité est l'étape limitante dans le processus de biodisponibilité. Néanmoins, cinq scénarios peuvent, en théorie, se présenter (12). Ces scénarios considèrent les deux principaux processus que sont la dissolution et l'absorption du contaminant, la métabolisation n'étant pas considérée comme une étape limitante dans le processus de biodisponibilité (métabolisation indépendante de la matrice) :

- Scénario 1 : une dissolution rapide et une absorption rapide du contaminant : état d'équilibre entre les deux processus. Les variations de la bioaccessibilité et de l'absorption détermineront de façon égale la biodisponibilité relative. Dans ce scénario, bioaccessibilité et biodisponibilité peuvent être égales à 100% ;
- Scénario 2 : une dissolution lente (non achevée avant le transit) et une absorption rapide : le processus de dissolution est limitant. Les variations de la bioaccessibilité détermineront la biodisponibilité relative. Dans ce scénario, la bioaccessibilité sera nettement inférieure à 100% et pourra être égale à la biodisponibilité si toutes les conditions du processus de dissolution correspondent exactement aux conditions du tractus gastro-intestinal de l'animal testé. Une correspondance complète n'est toutefois vraisemblablement pas atteignable. Mais une corrélation linéaire entre bioaccessibilité *in vitro* et biodisponibilité *in vivo* peut alors être établie. Dans ce scénario, la bioaccessibilité absolue mesurée *in vitro* pour un contaminant peut être supérieure ou inférieure à sa biodisponibilité (absolue ou relative), mais la bioaccessibilité relative devrait être équivalente à la biodisponibilité relative du contaminant ;

- Scénario 3 : une dissolution rapide et une absorption lente (non achevée avant le transit) : le processus d'absorption est limitant. C'est l'absorption qui déterminera la biodisponibilité relative. Dans ce scénario, aucune corrélation entre bioaccessibilité *in vitro* et biodisponibilité *in vivo* ne peut être établie ;
- Scénario 4 : aucune dissolution (ou presque). Dans ce cas, la bioaccessibilité *in vitro* peut prédire la biodisponibilité des contaminants car elle reste le processus limitant de la biodisponibilité du contaminant ;
- Scénario 5 : aucune absorption (ou presque). Dans ce cas, la bioaccessibilité *in vitro* ne peut pas prédire la biodisponibilité des contaminants car l'absorption est le processus limitant de la biodisponibilité du contaminant.

A noter que le contaminant peut être présent sous plusieurs formes dans les sols ingérés et dans le tractus gastro-intestinal. De ce fait, plusieurs scénarios peuvent se combiner rendant plus délicate l'estimation de la biodisponibilité *in vivo* à partir d'une bioaccessibilité *in vitro*.

Selon les auteurs, les comparaisons entre *in vivo* et *in vitro* ne sont pas effectuées strictement de la même manière :

- **concernant les résultats** : certains comparent des bioaccessibilités absolues à des biodisponibilités absolues et/ ou relatives. D'autres, comparent des bioaccessibilités relatives à des biodisponibilités relatives. Afin d'éviter tout biais d'interprétation, une comparaison des données de biodisponibilités et bioaccessibilités relatives (étude R/R) devrait être privilégiée (18).  
De plus, concernant les données de biodisponibilité utilisées dans ces études de corrélation, certains ont fait le choix de calculer une valeur moyenne équivalant à la moyenne des biodisponibilités relatives obtenues pour chaque organe cible étudié dans le cadre de l'expérimentation (26), alors que d'autres auteurs ont jugé plus pertinent de déterminer (sur la base d'éléments statistiques) le meilleur organe cible (donnant la meilleure réponse biologique) et de le comparer aux résultats *in vitro* (18).
- **concernant les critères statistiques utilisés pour juger de la robustesse de la corrélation** : la majorité des études de corrélation *in vivo* / *in vitro* se base uniquement sur la valeur du coefficient de corrélation  $r^2$  et sur sa significativité statistique. Certains estiment qu'une corrélation peut être jugée robuste si  $r^2$  est supérieur à 0,6 (18)(59).

D'autres auteurs, tel que Caboche (18), ont proposé de vérifier également d'autres critères :

- pour avoir une corrélation robuste, il estime que celle-ci doit être déterminée sur une large gamme de valeur de biodisponibilité (variation d'au moins 70 points entre la valeur la plus faible et la plus forte) et avec des valeurs correctement réparties tout le long de la droite de corrélation,
- pour que le test *in vitro* soit jugé comme simulant correctement la physiologie du tractus digestif, la pente de la droite de régression doit être non significativement différente de 1, dans ce cas, il peut-être considéré que l'hypothèse de base de ces essais est alors vérifiée, à savoir que l'absorption est indépendante de la matrice initiale.

Si la pente est significativement différente de 1, alors il existe un écart par rapport à la réalité *in vivo*. Néanmoins, si une corrélation linéaire significative est observée ( $r^2 > 0,6$ ), cela signifie que la bioaccessibilité demeure l'étape limitante du processus de biodisponibilité.

## **ii) Recensement des études de corrélation *in vivo/in vitro***

Le plus grand nombre d'études de corrélation *in vivo / in vitro* a été réalisé pour l'arsenic, le plomb puis le cadmium. Les travaux relatifs aux molécules organiques sont nettement moins nombreux et, en général, plus récents (2004 à 2011).

Ce chapitre recense les principales études de corrélation effectuées pour chaque polluant et chaque test de bioaccessibilité. Les coefficients de détermination  $r^2$  indiqués (coefficient permettant de juger de la robustesse d'une corrélation) sont ceux statistiquement significatifs (en général de  $p < 0,001$  à  $< 0,05$ ) selon les auteurs qui les ont produits (sauf si précisé).

Le Tableau 9 récapitule l'ensemble des équations de corrélations *in vivo/in vitro* recensées dans la bibliographie. A noter que les équations sont toutes présentées en considérant la biodisponibilité (y) en fonction de la bioaccessibilité (x), selon  $y = a x + b$ , ce qui n'était pas le cas pour tous les auteurs (conversions nécessaires dans certains cas).

Les informations suivantes sont précisées dans le tableau :

- coefficients de détermination  $r^2$  obtenus dans chaque compartiment étudié,
- précision si ce sont les biodisponibilité et bioaccessibilité absolues ou relatives qui ont été comparées,
- nombre et nature des sols intégrés dans l'étude de corrélation,
- gamme de valeurs de biodisponibilité obtenue.

La plupart des études de biodisponibilité utilisées a été réalisée avec le modèle animal porc, à l'exception des études suivantes :

- Ruby *et al.* (64), le modèle animal étant le rat,
- Lowney *et al.* (80), le modèle étant le singe, et
- Grøn *et al.* (81), dans laquelle une partie des résultats de biodisponibilité est issue d'un test sur souris.

Par ailleurs, sont présentés en gras dans le tableau :

- les coefficients  $r^2$  supérieurs à 0,6,
- les équations de corrélations pour lesquelles les pentes sont proches de 1 (comprises entre 0,8 et 1,2) et le  $r^2$  est supérieur à 0,6,
- les gammes de biodisponibilité larges (variation d'au moins 70 % entre la valeur la plus faible et la plus forte).

Ceci a pour objectif d'identifier les études mettant en évidence des corrélations robustes et pour lesquelles les essais de biodisponibilité *in vitro* miment correctement les phénomènes se déroulant *in vivo* (d'après les critères définis précédemment).

**Tableau 9 : Ensemble des équations rencontrées dans la littérature des droites de corrélations obtenues entre la biodisponibilité relative (RBD) et la bioaccessibilité absolue ou relative (BAc)**

Substance	Auteur (publications)	Test de bioaccessibilité	Modèle animal pour l'étude de la biodisponibilité	BAC (A ou R) / BD (A ou R)	Equation dans la phase gastrique (PG)	Equation dans la phase intestinale (PI)	$r^2$ Phase Gastrique	$r^2$ Phase Intestinale	Nombre/type de sols étudiés	Gamme de biodisponibilité
Arsenic	Juhasz <i>et al.</i> , 2009 (82)	SBRC	porc	A/R	<b>RBD (%) = 0,992 x BAc (%) + 1,656</b>	RBD (%) = 1,644 x BAc (%) + 5,626	<b>0,754 np</b>	<b>0,654 np</b>	12 sols variés	<b>6,9-74,7 %</b>
		IVG		A/R	RBD (%) = 0,853 x BAc (%) + 14,323	RBD (%) = 1,105 x BAc (%) + 13,971	0,573 np	0,567 np		
		PBET		A/R	<b>RBD (%) = 1,162 x BAc (%) + 10,096</b>	RBD (%) = 1,762 x BAc (%) + 5,682	<b>0,638 np</b>	<b>0,665 np</b>		
		DIN		A/R	RBD (%) = 1,774 x BAc (%) + 5,732	RBD (%) = 1,46 x BAc (%) + 9,2	0,546 np	0,532 np		
	Gron et Anderson (2003) (12)	DIN	porc	A/R	np	RBD (%) = 1,774 x BAc (%) + 5,732	np	<b>0,8416 np</b>	6 sols	np
	Medlin, 1995 reporté par Caboche, 2009, (18)	SBRC	porc	A/R	RBD (%) = 2,273 x BAc (%) + 12,955	Sans objet	0,4 np	Sans objet	7 sols	2-60 %
	Juhasz <i>et al.</i> , 2007 (83)	SBET	porc	A/R	<b>RBD (mg/kg) = 0,93 x BAc (mg/kg) + 14,19</b>		<b>0,92 p &lt; 0,01</b>		49 sols d'origine variée	<b>6,9-74,7 %</b>
	Lowney, 2006 (BARC, Exponent (80)	RBALP (pH = 2,5)	singe	A/R	RBD (%) = 0,1498 x BAc (%) + 11,859		0,2747 np		10 <i>a priori</i> (lecture graphique) -	np
		RBALP (pH = 1,5)		A/R	RBD (%) = 0,1137x BAc (%) + 11,394		0,1889 Np			
		HCl hydroxylamine (1 heure		A/R	RBD (%) = 0,2262x BAc (%) + 1,8263		<b>0,6871 np</b>			
	US-EPA, 2005 (27)	SBRC/RBALP	porc	A/R	RBD (%) = 0,3538 x BAc (%) + 0,234		0,173 P < 0,06		21 sols	18-52
					np		0,452 np		16 (certains sols exclus)	
	Basta <i>et al.</i> , 2007 (62)	IVG avec aliment ( <i>in vivo</i> = sang)	porc	A/R	<b>RBD (%) = 1,075 x BAc (%) + 6,25</b>	RBD (%) = 1,22 x BAc (%) + 6,02	<b>0,922 p &lt; 0,01</b>	<b>0,922 p &lt; 0,01</b>	10 sols miniers	2,7-42,8 %
		IVG sans aliment ( <i>in vivo</i> = sang)		A/R	RBD (%) = 1,299 x BAc (%) +6,649	RBD (%) = 1,887 x BAc (%) + 7,47	<b>0,846 p &lt; 0,01</b>	<b>0,81 p &lt; 0,01</b>		
	Rodriguez <i>et al.</i> , 1999 (57)	IVG	porc	A/R	<b>RBD (%) = 1,136* x BAc (%) + 2,295*</b>	RBD (%) = 1,316 x BAc (%) + 1,789	<b>0,689 p &lt; 0,01</b>	<b>0,672 p &lt; 0,01</b>	13 matrices typiques de sites miniers et de fonderie (déchets stockés)	2,7-42,8 %
		IVG - AB		A/R	<b>RBD (%) = 1,149 x BAc (%) + 1,356</b>	RBD (%) = 1,351 x BAc (%) - 0,203	<b>0,64 p &lt; 0,05</b>	<b>0,624 p &lt; 0,05</b>		
		PBET		A/R	RBD (%) = 1,724 x BAc (%) - 3,328	RBD (%) = 2,564x BAc (%) + 0,179	0,26 (non significatif)	0,562 p < 0,05		
	Oomen, <i>et al.</i> , 2006 (13)	RIVM (0,06 g)	porc	R/R	<b>RBD (%) = 0,802 x BAc (%)</b>	<b>RBD (%) = 0,9568 x BAc (%)</b>	<b>0,9083 np</b>	<b>0,7962 np</b>	8 sols	2-3 à < 45% (lecture graphique)
		RIVM (0,6 g)		R/R	<b>RBD (%) = 1,8850 x BAc (%)</b>	RBD (%) = 5,1787x BAc (%)	<b>0,9366 np</b>	0,2666 np		
	Caboche, 2009 (18)	UBM	porc	R/R	<b>RBD (%) = BAc (%) + 0,01</b>	<b>RBD (%) = 0,990 x BAc (%) – 0,039</b>	<b>0,98 p &lt; 0,01</b>	<b>0,97 p &lt; 0,01</b>	13 sols variés	<b>3-72 %</b>
Plomb	Ruby <i>et al.</i> , 1996 (a)(64)	PBET (pH = 2,5)	rat	R/R	RBD (%) = 1,4 x BAc (%) + 3,2*	np	<b>0,93 np</b>	np	7 sols miniers	8,7-36%
	Juhasz <i>et al.</i> , 2009 (84) et 2010 (44)	SBRC - G	porc	A/R	RBD (%) =-0,18 x BAc (%) + 25,26*	Sans objet	0,12 np	Sans objet	5 sols variés	10,1-19,1 %
		SBRC - I			Sans objet	RBD (%) = 4,07x BAc (%) + 6,84*	Sans objet	0,14		
		-Rel SBRC -I	porc	R/R	Sans objet	RBA (%) = 0,580 x BAc (%) + 1,980	Sans objet	0,530		
	Medlin, 1995 reporté par Caboche, 2009 (18)	SBRC	porc	A/R	<b>RBD (%) = 1,149 x BAc (%) - 7,816</b>	sans objet	<b>0,85 np</b>	Sans objet	15 sols	<b>2-83%</b>
	Drexler et Brattin, 2007 (59) US-EPA, 2009 (85)	SBRC/RBALP (0,4 M Glycine, pH= 1,5)	porc	A/R	<b>RBD (%) = 0,878 x BAc (%) - 0,028</b>		<b>0,924 p&lt;0,001</b>		19 matrices	<b>1-105 %</b>
	Schroder <i>et al.</i> , 2004 (86)	IVG avec aliment ( <i>in vivo</i> = sang)	porc	A/R	RBD (%) = 2,564 x BAc (%) - 7,615	RBD (%) = 100 x BAc (%) - 0,02	<b>0,865 p &lt; 0,001</b>	<b>0,64 p &lt; 0,001</b>	11à 18 sols	<b>1-87 % (sang)</b>
		IVG sans aliment ( <i>in vivo</i> = sang)		A/R	RBD (%) = 1,538 x BAc (%) + 2,215	RBD (%) = 100 x BAc (%) - 52	<b>0,792 p &lt; 0,001</b>	0,144 (non significatif)		
	Gron et Anderson (2003) (12)	DIN	porc	A/R	Pas de corrélation				6 sols	np
	Oomen, <i>et al.</i> , 2006 (13)	RIVM (0,06 g)	porc	R/R	<b>RBD (%) = 0,926 x BAc (%)</b>	<b>RBD (%) = 0,859 x BAc (%)</b>	<b>0,6784 np</b>	<b>0,6588 np</b>	10 sols variés	<b>1-105 %</b>
		RIVM (0,6 g)		R/R	RBD (%) = 1,268 x BAc (%)	RBD (%) = 1,447x BAc (%)	<b>0,9477 np</b>	<b>0,8119 np</b>	7 sols variés	
	Gron <i>et al.</i> , 2005 (19)	SBRC	porc	R/R	RBD (%) = 1,449 X BAc (%) – 0,406	<b>Sans objet</b>	<b>0,630</b>	Sans objet	18	
		RIVM (tous les pH confondus)	porc	R/R	RBD (%) = 2,083 x BAc (%) -0,229	np	0,138 (non significatif)	np	18	np
		RIVM (pH gastrique < 1,8) (c)			RBD (%) = 1,471 X BAc (%) – 0,25		<b>0,758</b>		12 sols	
	Caboche 2009 (18)	UBM	porc	R/R	<b>RBD = 0,909 x BAc (%) – 1,691</b>	<b>RBD = 0,917 x BAc (%) – 1</b>	<b>0,93 p &lt; 0,01</b>	<b>0,89 p &lt; 0,01</b>	14 sols variés	<b>10-82%</b>
Cadmium	Juhasz <i>et al.</i> , 2010 (44)	PBET	porc	A/R	np	<b>RBD (%) = 1,091 X BAc (%) – 5,140</b>	<b>0,74 np</b>	<b>0,835 np</b>	7 sols variés	<b>10,1-92,1%</b>
	Schroder <i>et al.</i> , 2003 (53)	IVG avec aliment ( <i>in vivo</i> = sang)	porc	A/R	RBD (%) = 5,263 x BAc (%) - 144,7	RBD (%) = 7,692 x BAc (%) – 39	0,302 non significatif	<b>0,64 p &lt; 0,01</b>	10 sols	<b>10,4-116 %</b>
		IVG sans aliment ( <i>in vivo</i> = sang)		A/R	RBD (%) = 1,667 x BAc (%) -42,2	RBD (%) = 4,762 x BAc (%) – 122,9	<b>0,740 p &lt; 0,01</b>	0,292 non significatif		



Substance	Auteur (publications)	Test de bioaccessibilité	Modèle animal pour l'étude de la biodisponibilité	BAC (A ou R) / BD (A ou R)	Equation dans la phase gastrique (PG)	Equation dans la phase intestinale (PI)	$r^2$ Phase Gastrique	$r^2$ Phase Intestinale	Nombre/type de sols étudiés	Gamme de biodisponibilité
	Gron <i>et al.</i> , 2005 (19)	RIVM	porc	R/R	RBD(%) = 1,136 x BAc (%) – 0,284	<b>RBD (%) = 1,075 x BAc (%) - 0,042</b>	0,575 np	<b>0,635 np</b>	17 (PG) ou 14 (PI) sols	15-115% environ (lecture graphique)
		SBRC		R/R	RBD(%) = 1,667x BAc (%) – 0,8	Sans objet	0,407		12	
	Caboche 2009 (18)	UBM	porc	R/R	<b>RBD (%) = 1,042 x BAc (%) – 2,771</b>	<b>RBD (%) = 1,064 x BAc (%) – 1,521</b>	<b>0,97 p&lt;0,01</b>	<b>0,91 p&lt;0,01</b>	10 sols variés	<b>13-96%</b>
Antimoine	Caboche 2009 (18)	UBM	porc	R/R	RBD (%) = 1,515 x BAc (%) - 6,364	RBD(%) = 1,064 x BAc (%) – 2,979	0,20 (non significatif)	0,27 (non significatif)	11 sols	1-11 % (urine)
12 HAP	Gron <i>et Anderson</i> , 2003 (12)	DIN (1 type de sol = Lothringen 2)	porc	A/R	np	<b>rétenion (≈ RBD) = 1,1376 x BAc (%) + 14,854</b>	np	<b>0,688 np</b>	1 sol : 12 points	np
		DIN (3 autres sols)		A/R	Pas de corrélation				3 autres sols : environ 30 points (lecture graphique)	np
		DIN		A/R	np	<b>rétenion (≈ RBD) = 1,0261 x BAc (%) + 22,889</b>	np	<b>0,7146 np</b>	4 sols (15 points)	np
8 HAP	James <i>et al.</i> , 2011 (58)	RBALP + PI Avec et sans membrane C18 (b)	porc	A/R	Aucune corrélation				8 sols	np
		IVD sans membrane C18 (b)		A/R	Aucune corrélation				8 sols	
		IVD avec membrane C18 (b)		A/R	np	Log [C] sérum = 1,176 x log [C] IVD – 0,106	np	0,45 p < 0,069	8 sols	
Benzo(a)pyrène	Gron <i>et al.</i> , 2007 (81)	RIVM	Souris et porc	R/R	<b>np</b>	RBD (%) = 3,1 x BAc (%) + 9,2	<b>np</b>	<b>0,814 np</b>	7 sols	7,3-55 %
Dibenzo (ah) anthracène			porc	R/R	Pas de corrélation				3 sols	27-30 %
Phenan-thrène	Pu <i>et al.</i> , 2004 (87)	PBET	rat	A/A	np	np	np	0,53 p < 0,05	4 sols	14,9-48,6

BAC = bioaccessibilité ; BD = biodisponibilité ; A = absolue ; R = relative ; Pi = phase intestinale  
 np : non précisé

- (a) Dans cette publication, Ruby *et al.*, indiquent page 428 que la bioaccessibilité est sur l'axe des abscisses (X), et p 429, qu'elle est sur l'axe des ordonnées (Y). En l'absence de graphique, il est impossible de connaître le véritable sens de l'équation de corrélation. Celle présentée dans ce tableau se réfère à une bioaccessibilité en abscisse (X) et une biodisponibilité en ordonnée (Y).
- (b) membrane destinée à servir de « pièges à lipides »
- (c) Exclusion de 6 sols pour lequel le pH en fin de phase gastrique était > 1,8

- Sont en gras dans le tableau :
- les  $r^2$  significatifs et supérieurs à 0,6,
  - les équations pour lesquelles les  $r^2$  sont significatifs et supérieurs à 0,6 et les pentes proches de 1, (comprises entre 0,8 et 1,2)
  - les gammes de biodisponibilité relativement larges (variation d'environ 70 %)

### iii) Principaux résultats

D'une manière générale, les auteurs des publications mettent en évidence des corrélations significatives avec un  $r^2$  satisfaisant ( $> 0,6$ , voire  $> 0,9$ ) dans l'un ou l'autre, ou les deux, compartiment(s) physiologique(s) étudié(s). Même si la diversité des études, en termes de protocole d'essais *in vitro* et *in vivo*, de nombre et nature des sols étudiés, etc., rend difficile la comparaison des résultats, quelques observations peuvent être mises en exergue.

Sur l'ensemble des équations recensées, 59 % présentent une corrélation avec  $r^2 > 0,6$ . Cette valeur cache toutefois une situation contrastée :

- les plus fortes proportions de corrélations significatives, avec  $r^2 > 0,6$ , sont obtenues pour le plomb (70 %), l'arsenic et le cadmium (63 %). Pour les molécules organiques, seules 3 équations sur 9 recensées (soit 33%) obtiennent un  $r^2 > 0,6$ . Sur ce point, il faut souligner que ce constat est directement associé au nombre d'études disponibles pour chaque polluant. Ainsi, et malgré le fait que peu d'études aient été menées sur les molécules organiques au regard des substances inorganiques (sous-estimant la proportion de corrélations potentiellement robustes), il faut noter que les travaux relatifs à ces molécules ont été conduits, en général, sur un nombre plus limité de sols que ceux relatifs aux éléments inorganiques, surestimant potentiellement la robustesse des corrélations mises en évidence.
- des corrélations très robustes (avec  $r^2 > 0,9$ ) ont également été obtenues pour les éléments inorganiques (22 % pour l'arsenic, 20 % pour le plomb et 18 % pour le cadmium) alors que pour les molécules organiques, aucun  $r^2$  n'est supérieur à 0,9.
- pour l'antimoine, uniquement étudié par Caboche (18), aucune corrélation significative n'a été mise en évidence dans aucun des deux compartiments du test UBM. L'auteur souligne toutefois que les résultats vont dans le même sens mais que cette absence de significativité peut être liée à des biodisponibilités et bioaccessibilités très faibles (ex :  $< 11$  % pour les premières). Pour les autres molécules inorganiques, pour lesquelles quelques travaux de mesure de la bioaccessibilité ont été réalisés (ex : mercure, nickel, zinc), aucune étude de corrélation n'a été menée.
- certains tests *in vitro*, comparés à l'*in vivo*, n'ont jamais bénéficié d'une corrélation significative pour certains contaminants. Pour les molécules inorganiques, il s'agit par exemple du test DIN pour le plomb. Pour les molécules organiques, il s'agit du test RBALP avec phase intestinale et du test IVD sans membrane en C18 pour 8 HAP, du test RIVM pour le dibenzo(ah)anthracène, et du test DIN pour 12 HAP dans 3 types de sols.
- pour les trois éléments inorganiques plomb, cadmium, arsenic, 76 % des corrélations sont plus robustes en phase gastrique qu'en phase intestinale. A noter que, pour les molécules organiques, les corrélations ont toutes été étudiées pour la phase intestinale des essais uniquement.
- La majorité des corrélations a été faite entre la bioaccessibilité absolue et la biodisponibilité relative (A/R). Pour la phase gastrique, l'utilisation de la bioaccessibilité absolue n'aura pas d'incidence significative sur la corrélation pour le plomb, l'arsenic, le cadmium et l'antimoine (bioaccessibilité absolue de la matrice de référence en phase gastrique proche de 100%). En revanche, pour le compartiment intestinal, l'utilisation des valeurs de bioaccessibilité absolue aura un impact sur la corrélation, notamment pour les éléments cationiques (du fait des phénomènes de précipitation et complexation qui se déroulent dans la phase intestinale pour les éléments cationiques) (18). Concernant les composés organiques, l'absence de différence significative entre les valeurs de bioaccessibilité absolue et relative n'est pas renseignée. Ainsi, l'étude de la bioaccessibilité relative *in vitro*, au lieu de la bioaccessibilité absolue, permet, au regard de la biodisponibilité relative *in vivo*, d'interpréter sans biais la corrélation linéaire obtenue (si le test *in vitro* mime correctement la réalité physiologique du tractus gastro-intestinal, la pente doit, *a priori*, être significativement peu différente de 1).
- Comme vu précédemment dans le scénario 2, la bioaccessibilité absolue mesurée *in vitro* pour un contaminant peut être supérieure ou inférieure à sa biodisponibilité (absolue ou relative). Il apparaît que pour 41% des études recensées bénéficiant d'une corrélation significative ( $r^2 > 0,6$ ), la bioaccessibilité absolue mesurée *in vitro* est significativement

inférieure à la biodisponibilité mesurée *in vivo* (pente > 1,2 en considérant une marge d'erreur de 20%). Parmi ces études (dont la bioaccessibilité absolue *in vitro* est inférieure à la biodisponibilité relative *in vivo*), 56% sont associées à une phase intestinale, ce qui tend à conforter le fait que l'étude de la bioaccessibilité absolue au regard de la biodisponibilité relative engendre un biais d'autant plus important dans la phase intestinale (du fait des phénomènes de précipitation et complexation qui s'y déroule, y compris pour une matrice de référence). En phase gastrique, où l'on peut supposer un moindre biais associé à l'étude de la bioaccessibilité absolue *in vitro* (biais A/R négligeable), ou dans les études R/R (par définition sans biais A/R), une pente > 1,2 signifie donc qu'il existe des incertitudes quant à la représentativité physiologique de la valeur de bioaccessibilité absolue issue du laboratoire, dans le sens d'une potentielle sous-estimation de la biodisponibilité.

- Il faut souligner la variabilité des résultats selon les auteurs, pour une même substance, un même test de bioaccessibilité et un même modèle animal. C'est par exemple le cas pour le plomb, avec le test *in vitro* SBRC (gastrique) et le test *in vivo* sur le porc :
  - Juhasz *et al.* (82) ont observé un faible coefficient de corrélation ( $r^2 = 0,12$ ), tandis que,
  - Drexler et Brattin (59), ainsi que Grøn *et al.* (19), ont calculé un  $r^2$  de, respectivement, 0,92 et 0,63.

Wragg *et al.* (69) ont également établi, pour le test UBM, des équations de corrélation *in vivo/in vitro*. Ces équations n'ont pas été présentées dans le Tableau 9 car, à la différence des autres auteurs qui ne considèrent que leurs propres résultats, elles ont été établies sur la base d'une étude inter-laboratoire. Ces corrélations ont donc été obtenues en tenant compte des résultats de l'ensemble des laboratoires participants pour lesquels la reproductibilité est parfois faible. Or, cette faible reproductibilité influe sur les équations en termes de pente et d'ordonnée à l'origine.

*A priori* aucune étude telle que celle de Wragg *et al.* (69) concernant le test UBM n'a été mise en œuvre pour les autres tests de mesure *in vitro* de la bioaccessibilité.

Les résultats obtenus par Wragg *et al.* (69) sont présentés dans le Tableau 10.

**Tableau 10 : Equations des droites de corrélation *in vivo* / *in vitro* (R/R, modèle porcin) obtenues pour le test UBM au cours de l'étude de Wragg *et al.* (2011) (69).**

Polluants	Ratio L/S	Compartiment	$r^2$	Pente <i>in vivo</i> / <i>in vitro</i>
As	100/1	PG	0,77	2,5
		PGI	0,63	6,3
	1000/1	PG	0,91	1,1
		PGI	0,83	1,1
Cd	100/1	PG	0,69	1,6
		PGI	0,51	1,8
Pb	100/1	PG	0,62	1,3
		PGI	0,57	2,6

En grisé, valeurs acceptables selon les critères fixés par les auteurs ( $r^2 > 0,6$  ; pente de la corrélation *in vivo/in vitro* comprise entre 0,8 et 1,2). PG : phase gastrique ; PGI : phase gastro-intestinale

Comme d'autres auteurs auparavant, Wragg *et al.* (69) retiennent :

- comme corrélés de façon robuste, les cas où le  $r^2$  est > 0,6 et,
- comme représentatifs des phénomènes *in vivo*, les cas où la pente est proche de 1 (pente entre 0,8 et 1,2).

Des relations linéaires avec un  $r^2$  robuste (> 0,6) sont observées pour la plupart des cas, à l'exception du plomb et du cadmium en phase gastro-intestinale. En revanche, contrairement à ce qui a été montré par Caboche (18), toutes les pentes obtenues dans cette étude avec le ratio L/S classique de 100/1 s'écartent significativement de 1 (elles sont supérieures à 1,2, la valeur de bioaccessibilité relative étant donc plus faible que la valeur de biodisponibilité relative). Seules les pentes obtenues pour l'arsenic avec le ratio 1000/1 sont proches de 1 dans les deux compartiments.

Les auteurs soulignent aussi que les performances des méthodes *in vivo* devraient également être améliorées. Ils signalent par exemple que les incertitudes des études *in vivo* sont en général plus élevées que celles des études *in vitro*.

Enfin, concernant les **tests SHIME et TIM** (qui n'apparaissent pas dans le Tableau 9), aucune étude de corrélation des résultats obtenus avec les tests SHIME et TIM n'est *a priori* disponible dans la littérature. Ces tests ont seulement été comparés à d'autres essais *in vitro/in vivo*, en termes de valeurs de bioaccessibilités obtenues par rapport aux valeurs de biodisponibilité.

- En 2007, Van de Wiele *et al.* (68) ont effectivement comparé la bioaccessibilité du plomb au moyen de 5 tests *in vitro* dont le modèle **SHIME** et le test **TIM** dynamique avec les résultats expérimentaux *in vivo* chez l'homme (48) avec et sans apport d'aliments. Les résultats de la publication sont présentés dans le Tableau 11: ils diffèrent tous de façon significative entre eux et au regard de la biodisponibilité orale obtenue chez l'homme. Toutefois, les tests RIVM et TIM sans apport de nourriture fournissent les valeurs les plus proches de la biodisponibilité *in vivo* (sans la sous-estimer), les autres tests (PBET, DIN et SHIME) montrant de sérieuses divergences.

**Tableau 11 : Résultats des tests *in vitro* pour le plomb sur le sol de référence Bunker Hill (2924 mgPb/kg sol PS) et comparaison aux résultats *in vivo* (tirés des travaux de Maddaloni *et al.*, 1998), d'après Van de Wiele *et al.* (68).**

Méthode	Bioaccessibilité Sans nourriture (%)	Biodisponibilité Sans nourriture (%)	Bioaccessibilité avec nourriture (%)	Biodisponibilité avec nourriture (%)
PBET	13	26,2	22	2,5
RIVM ratio LS 100 : 1	32		24	
RIVM ration LS : 1000 : 1	47		39	
DIN	14		29	
SHIME	2		24	
TIM	32		7	

- Dans le cadre de l'étude BARC (56), des données de bioaccessibilité, mesurées selon différents tests *in vitro*, ont également été comparées à des données de biodisponibilité *in vivo* obtenus chez les porcelets, pour l'arsenic et le plomb. Le test SHIME fournit les valeurs ayant les plus grands écarts par rapport aux données de biodisponibilité pour l'arsenic et le plomb.

#### **iv) Essais de répétabilité, reproductibilité**

Il convient également, pour les tests physiologiques *in vitro*, de vérifier leur répétabilité (variations intra-laboratoires) et leur reproductibilité (variations inter-laboratoires).

La plupart des auteurs ayant développé et/ou mis en œuvre des essais de bioaccessibilité a réalisé des mesures en réplicats (nombre variable de 3 à 50) et ont ainsi déterminé des valeurs relatives à la répétabilité intra-laboratoire. Ils ont en général fourni :

- soit des coefficients de variation (CV ou « relative standard deviation – RSD »)
- soit des écarts-types (ou « standard deviation – SD ») et moyennes permettant de calculer des CV selon la formule suivante :  $CV \text{ ou } RSD = SD / \text{moyenne} \times 100 \%$ .

Des exemples sont reportés dans le Tableau 12. Ne sont reportées dans le Tableau 12 que des valeurs de CV calculées pour un même échantillon et pour un même test de bioaccessibilité (soit la précision intralaboratoire).

En général, le coefficient de variation pour la répétabilité est inférieur à 10%, au moins dans la phase gastrique, pour l'ensemble des tests, ce qui est considéré comme satisfaisant selon les auteurs ( ex : Wragg *et al.* (69)).

**Tableau 12 : Exemples de valeurs de coefficients de variation relatives à la répétabilité de différents essais de bioaccessibilité.**

Sources	Tests	Polluants	Nombres - types de matrices	Nombre de répliqués par matrice	CV répétabilité en % (ou RSD)	
					Phase gastrique	Phase intestinale
Drexler et Brattin, 2007 (59)	RBALP	Pb	19 matrices	3	1,4 à 6,3 en moyenne <sup>b</sup>	
Smith <i>et al.</i> , 2009 (39)	SBET	As	50 sols de 4 origines différentes	3	< 2 <sup>b</sup>	
Juhasz <i>et al.</i> , 2009 (84)	SBRC-G et -I	Pb	5 sols	Non précisé	0,3 à 7,5 <sup>a</sup>	6,7 à 25 <sup>a</sup>
	Rel-SBRC-I	Pb	5 sols	Non précisé		18,1 à 24,9 <sup>a</sup>
Schroder <i>et al.</i> , 2003 (53)	IVG avec et sans nourriture	Cd	1 sol	12	2,08 et 6,61 <sup>b</sup>	7,80 et 2,78 <sup>b</sup>
Lu <i>et al.</i> , 2010 (41)	IVG	As Pb	25 sols chinois (7 d'aires résidentielles, 6 d'aires industrielles, 6 de parcs urbains et 6 de bords de routes)	3	< 10 <sup>b</sup>	
Oomen <i>et al.</i> , 2003 (71)	RIVM	Pb	14 sols	5 ou 6	<10 % pour 12 sols <sup>a</sup> 17,6 et 25,0 % pour 2 sols <sup>a</sup>	
Oomen <i>et al.</i> , 2006 (13)	RIVM (0,06 g de sol)	Pb	11 matrices	non précisé	En général < 10 % (pour 10 matrices) <sup>a</sup> = 16,2 % pour 1 matrice (PG) <sup>a</sup>	
Grøn, 2005 (19)	RIVM	Pb Cd Ni BaP DBahA	non précisé	12 12 12 4 4	5,0 9,7 6,2 3,0 13,0	
Caboche, 2009 (18)	UBM	As Pb Cd Sn	2 sols de référence NIST 2710 - NIST 2711	50	5,6-2,1 3,2-5,3 9,5-2,8 4,5-12,9	5,5-5,0 2,8-7,0 5,5-9,9 11,0-17,1
		As Pb Cd Sn	15 sols (proximité de fonderies et sols miniers)	5 (médianes indiquées)	9,4 5,6 4,0 14,3	10,0 7,1 7,5 16,4
Pelfrene <i>et al.</i> , 2010 (88)	UBM	Cd Pb Zn	3 sols agricoles 3 sols urbains	3	0,4 à 3,9 0,4 à 2,7 0,7 à 4,1	1,9 à 10,7 0,6 à 33,3 1,1 à 10,9
BARC, 2011 (56)	17 tests	14 éléments	Sol de référence SMR 2710	5 par test	En général < 15 % (13 cas sur 14)	< 15 % (dans 8 cas sur 12)

<sup>a</sup> calculés selon la formule suivante :  $CV = SD/moyenne \times 100\%$  ; <sup>b</sup> reportés par les auteurs  
BaP = benzo(a)pyrène ; DBahA : dibenzo(ah)anthracène

Peu d'études de reproductibilité ont été menées au sens strict du terme, c'est-à-dire l'étude d'un même sol par plusieurs laboratoires, selon une même procédure de test :

- le test RBALP (tests physiologique simple consituté d'une unique phase gastrique) étudié par Drexler et Brattin (59) ;
- le test UBM (tests physiologique complexe consituté d'une phase gastrique et d'une phase intestinale), issu d'un effort d'harmonisation a bénéficié d'une récente étude par Wragg *et al.* (69).

Drexler et Brattin (59) ont évalué certaines performances de la procédure RBALP validée par l'US-EPA pour mesurer la bioaccessibilité du plomb. Ces auteurs ont ainsi déterminé que la précision de la méthode (reproductibilité intra-laboratoire) était d'environ 7% (évaluée pour deux matériaux de référence SMR 2710 et 2711 à partir des résultats obtenus au cours de plusieurs années sur respectivement 75 et 83 réplicats). Par ailleurs, ils ont calculé des coefficients de variation inter- et intra laboratoire sur 19 matrices de, respectivement, 4 et 6% environ. Enfin, ils estiment l'erreur absolue<sup>27</sup> moyenne à 10 % et l'erreur prédictive moyenne à 20 % par rapport aux résultats de biodisponibilité obtenus chez le porc.

Wragg *et al.* (69) ont évalué le test UBM : sept laboratoires ont mis en œuvre ce test afin d'estimer la bioaccessibilité de l'arsenic (sur 11 échantillons), du cadmium (sur 9 échantillons) et du plomb (sur 13 échantillons).

Des coefficients de variation intra- (répétabilité) et inter- laboratoires (reproductibilité) ont été calculés. Ils varient en moyenne, selon le polluant et le compartiment du test considéré (estomac ou intestin) (détails fournis dans le Tableau 13) :

- de 3,8 à 14,6 % concernant la répétabilité intra-laboratoire,
- de 7,4 à 81,4 % concernant la reproductibilité inter-laboratoire.

**Tableau 13 : Variations intra- et inter-laboratoires et, équations des droites de corrélation entre bioaccessibilité *in vitro* et biodisponibilité *in vivo* (modèle porc) obtenues pour le test UBM au cours de l'étude de Wragg *et al.* (69).**

Polluants	Ratio liquide solide	Compartiment	RSD médiane intra-laboratoire (répétabilité)	RSD médiane inter-laboratoire (reproductibilité)
As	100 : 1	PG	5,70	29,47
		PGI	6,92	25,94
As	1000 : 1	PG	3,83	7,43
		PGI	7,26	15,72
Cd	100 : 1	PG	3,90	7,00
		PGI	9,16	35,32
Pb	100 : 1	PG	3,59	22,78
		PGI	14,62	81,39

En grisé, valeurs acceptables selon les critères fixés par les auteurs (RSD répétabilité < 10 % ; RSD reproductibilité < 20 % ;  $r^2 > 0,6$  ; pente de la corrélation *in vivo/in vitro* comprise entre 0,8 et 1,2).

PG : phase gastrique ; PGI : phase gastro-intestinale

Les auteurs se sont fixé des critères de validation des tests (sur la base de ceux employés dans l'industrie pharmaceutique et d'une revue bibliographique relative à la bioaccessibilité dans les sols). Les critères des auteurs sont les suivants :

- répétabilité intra-laboratoire RSD ou CV < 10 %,
- reproductibilité inter-laboratoire RSD ou CV < 20 %.

**Ainsi les tests UBM menés, d'une part, pour l'arsenic avec un ratio L/S de 1000/1 en phase gastrique et gastro-intestinale, et d'autre part pour le cadmium avec un ratio L/S de 100/1 en phase gastrique, respectent les critères fixés en termes de répétabilité et reproductibilité.**

D'autres observations concernant la répétabilité et la reproductibilité des essais de bioaccessibilité peuvent être soulignées :

<sup>27</sup> Dans les statistiques, l'erreur absolue moyenne est une quantité utilisée pour mesurer comment les prévisions ou prédictions sont proches aux résultats éventuels.

- la répétabilité et la reproductibilité sont variables en fonction du sol. Par exemple, les RSD calculées (dans l'étude de Wragg *et al.* (69)) pour le sol BGS102 faiblement contaminé sont plus élevées que pour les sols de référence NIST 2710 et 2711 fortement contaminés. Ceci est cohérent avec ce qui est observé avec d'autres méthodes analytiques. En général, répétabilité et reproductibilité sont plus faibles (CV plus élevés) lorsque les concentrations diminuent et en particulier s'approchent des limites de quantification,
- selon les résultats présentés, et comme souligné par les auteurs de l'étude BARC (2011) (56) et Wragg *et al.* (69), la répétabilité et la reproductibilité pour les éléments cationiques tels que le cadmium, le zinc et le plomb sont en général plus faibles dans la phase intestinale par rapport à la phase gastrique. Ceci pourrait être lié, selon les auteurs, aux phénomènes de précipitation et d'adsorption qui ont lieu dans l'intestin et qui sont peu reproductibles.
- A noter ici que Caboche (18) a opéré à un contrôle plus strict du pH de la phase gastrique (1,2 +/-0,05), de même que Pelfrene *et al.* (88) (1,5+/-0,05), alors que dans l'étude de Wragg *et al.* (69), en fin de phase gastrique, le pH est de 1,5+/-0,2 pour la majorité des échantillons, conformément au protocole, soit une tolérance plus large. De plus, pour quelques échantillons, des pH plus élevés, jusqu'à 4 voire 5, ont été atteints. Ceci pourrait expliquer la faible reproductibilité du test UBM observée dans l'étude inter-laboratoire de Wragg *et al.* (69).

En mettant en relation les performances du test UBM en terme de répétabilité et de reproductibilité avec celles en terme de corrélation *in vivo/in vitro* (cf section précédente), Wragg *et al.* indiquent que le test UBM ne respecte l'ensemble des critères de validité<sup>28</sup> que pour l'arsenic avec un ratio L/S de 1000/1, ratio plus élevé que celui classiquement retenu. Pour rappel, deux hypothèses pouvant expliquer les meilleures performances de l'essai UBM pour l'arsenic conduit avec le ratio L/S plus élevé de 1000/1 sont évoquées par les auteurs :

- élimination des problèmes liés à la saturation des sites de fixation de l'arsenic,
- diminution des effets matrices négatifs (par dissolution plus importante des espèces chimiques qui pourraient nuire à l'analyse).

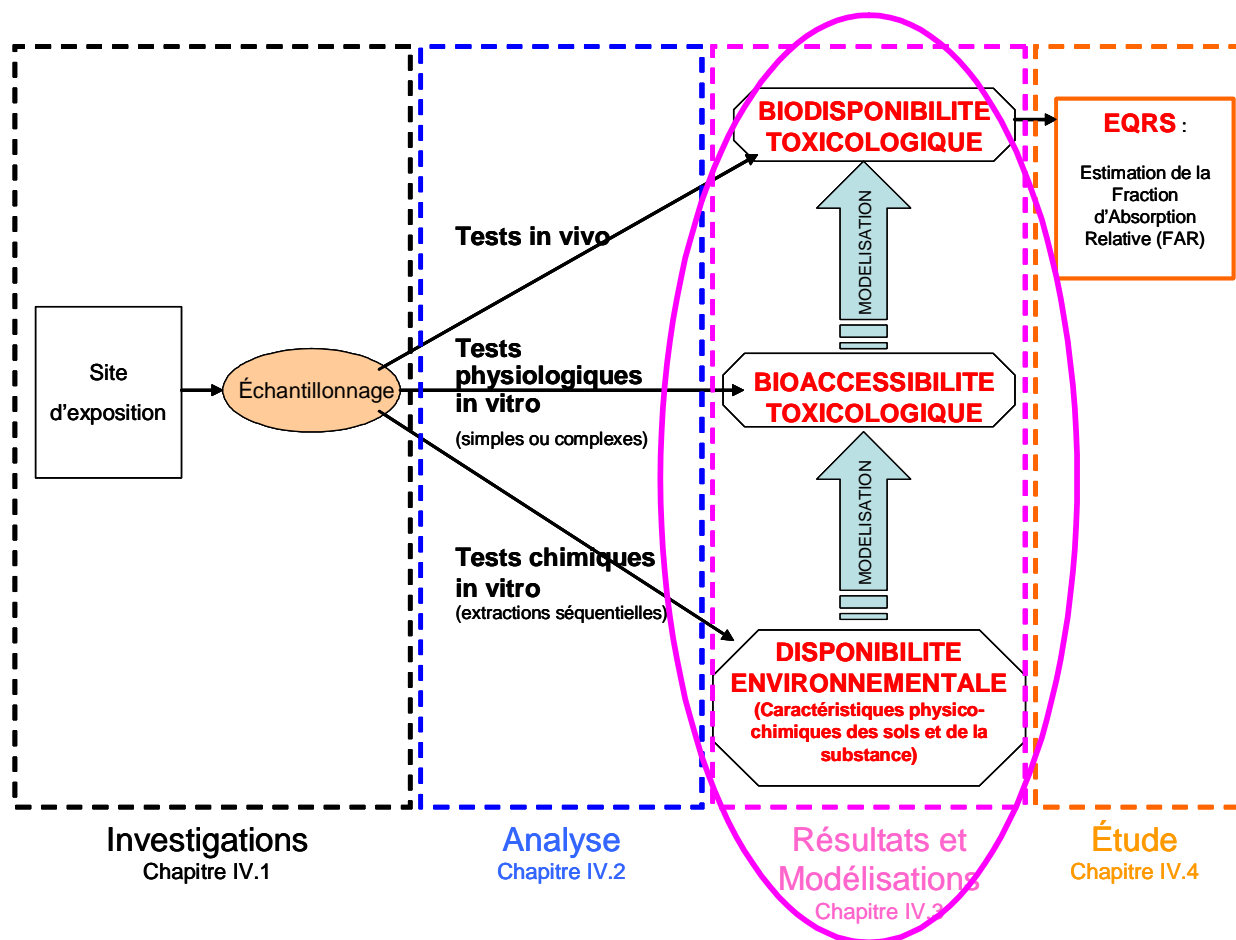
Il est également à noter que seuls 2 laboratoires (contre 7) ont réalisé l'essai avec ce ratio 1000/1, ce qui peut aussi conduire à améliorer la reproductibilité. Le poids statistique d'une étude avec un nombre plus restreint de participants est néanmoins plus limité.

Suite à leur étude, Wragg *et al.* (69) préconisent d'autres travaux afin d'affiner au mieux le protocole du test UBM en vue d'améliorer sa répétabilité et sa reproductibilité. D'une façon générale, Si les tests deviennent plus répétables et reproductibles, il est possible que les corrélations mises en évidence s'améliorent également et ne souffrent plus de certains biais.

---

<sup>28</sup> RSD répétabilité < 10 % ; RSD reproductibilité < 20 % ;  $r^2 > 0,6$  ; pente de la corrélation *in vivo/in vitro* comprise entre 0,8 et 1,2

### IV-3. Résultats et Modélisations

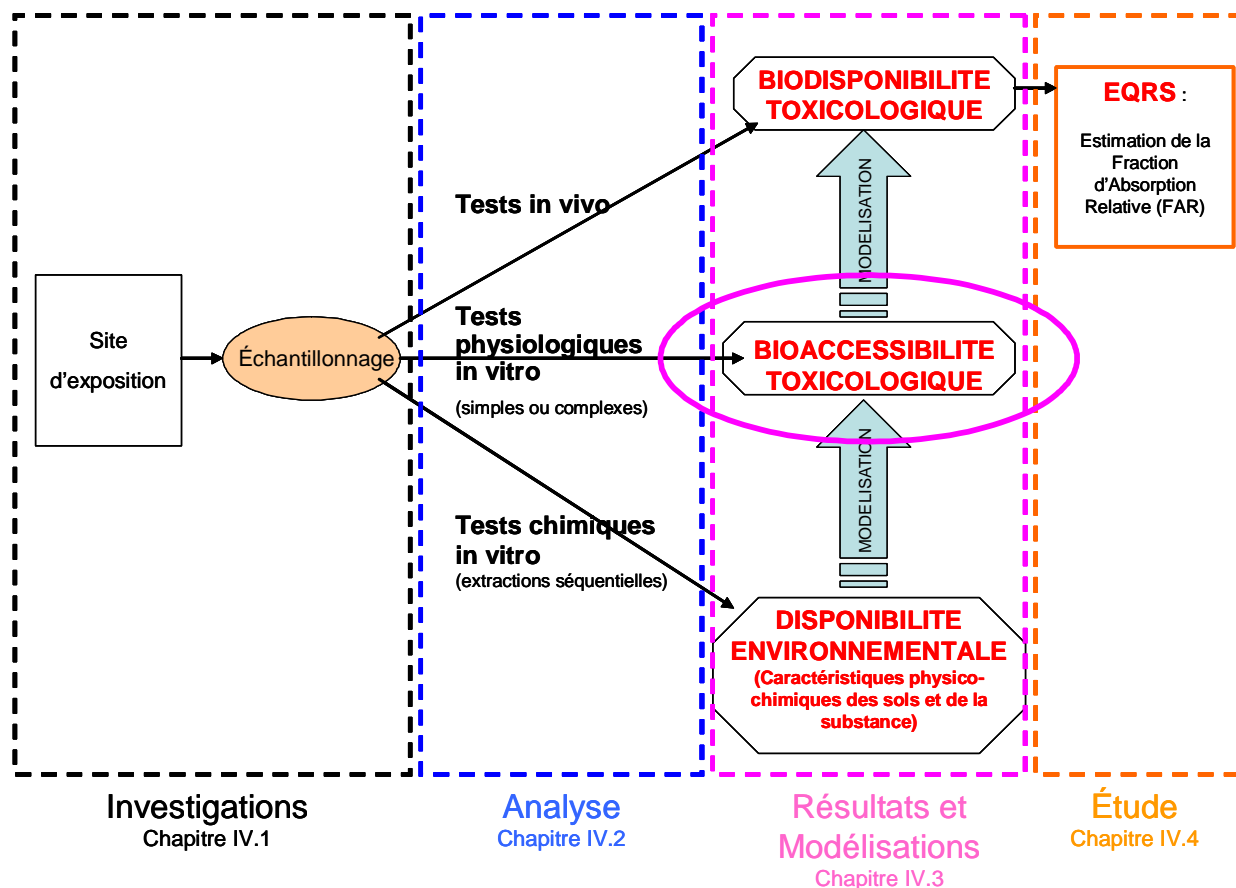


Cette section a pour objectif de présenter les résultats des études de bioaccessibilité de contaminants du sol obtenus par la mise en œuvre de différents protocoles décrits précédemment.

Ce chapitre décrit également l'ensemble des « modélisations » à disposition de l'évaluateur de risque lui permettant d'estimer la biodisponibilité relative de la substance qu'il étudie, à partir, d'une part, des données environnementales à disposition concernant les sols et la substance, et d'autre part, à partir des données de bioaccessibilité obtenues *via* les tests physiologiques *in vitro* décrits précédemment.



### IV.3.1. Principaux résultats en termes de bioaccessibilité



Suite à l'analyse des publications recueillies, des tableaux récapitulatifs, fournis en ANNEXE 4 pour les molécules inorganiques et ANNEXE 5 pour les molécules organiques, ont été constitués et présentent, par polluant, les principales caractéristiques des études mises en œuvre et les résultats obtenus.

Par référence bibliographique, sont notamment précisés :

- les caractéristiques de la matrice testée (pH, taille des particules, concentration en carbone organique total),
- le polluant concerné : sa concentration totale dans la matrice, et sa spéciation si connue (pour les éléments inorganiques). Si cela est indiqué, la présence d'autres polluants est également notifiée ;
- le cas échéant, les résultats de(s) essais de biodisponibilité (organismes tests et valeurs de biodisponibilité en pourcentage),
- les résultats de(s) essais de bioaccessibilité (méthode, précision des phases employées et valeurs de bioaccessibilité en pourcentage).

#### IV.3.1.1 Principaux résultats de bioaccessibilité concernant les contaminants inorganiques

En général, les publications traitent de résultats de bioaccessibilité obtenus selon un seul test mais certains auteurs ont également mis en œuvre pour des mêmes matrices, plusieurs essais de bioaccessibilité, ou un même essai avec des modalités différentes (ex : en présence d'aliments ou non, sur des fractions granulométriques différentes, ...).

La bioaccessibilité du plomb est la plus étudiée et a fait l'objet de travaux ayant mis en œuvre la plupart des essais de bioaccessibilité décrits. Viennent ensuite la bioaccessibilité de l'arsenic puis celle du cadmium. Pour l'arsenic, la procédure SHIME a en particulier été utilisée. Elle mime le colon dans lequel une flore microbienne est ajoutée. La bioaccessibilité du cadmium a notamment été étudiée de façon plus récente en France via le test UBM (2009 – 2010).

Quelques études se sont également intéressées à d'autres éléments inorganiques (zinc, chrome, antimoine, nickel, mercure). Les bioaccessibilités du zinc et de l'antimoine ont été investiguées récemment en France *via* le test UBM. Pour le chrome et le nickel au contraire, les études sont plus anciennes et n'ont mis en œuvre que le PBET et l'essai BM/RS (1998 à 2003). Concernant le mercure, des procédures simples (sans mise en conditions physiologiques) ont été mises en œuvre à quelques reprises (79)(72)(89).

Sur la base des données fournies en ANNEXES 4 et 5, le Tableau 14 indique, par élément, le nombre d'études recensées depuis 1998 (liste probablement non exhaustive) ainsi que, par test, les valeurs minimales et maximales de bioaccessibilité dans les phases gastriques et intestinales déjà mesurées (toutes études confondues). Ce tableau a uniquement pour objectif de montrer la grande disparité des valeurs de bioaccessibilité pouvant être obtenues. Les paramètres pouvant être à l'origine de ces variabilités sont traités dans le chapitre IV.3.1.3 sur les paramètres sensibles de la mesure de la bioaccessibilité.

**Tableau 14 : Variabilité des valeurs de bioaccessibilité des éléments inorganiques**

Eléments	Nombres de publications recensées et étudiées dans le cadre de ce contrat	Essais mis en œuvre	Phase gastrique (PG)		Phase intestinale (PI)	
			Bac minimale en %	Bac maximale en %	Bac minimale en %	Bac maximale en %
Plomb	25	PBET	3,8	83	0,6	100
		SBET +/- PI	0,5	91	0	80
		BM/RS	52	77	4,9	69
		IVG	0,7	73	0	3,23
		DIN	-	-	2 (sans lait)	68 (avec lait)
		RIVM	3,7	85	1,1	73
		UBM	10	95	1,22	59
		TIM	-	-	4	35,5
		SHIME	-	-	2	24
		<i>Tous les tests confondus</i>	0,5	95	0	100
Arsenic	19	PBET	0,05	47	0,19	50
		SBET +/- PI	0,1	59	0	89
		BM/RS	-	69	4,5	66
		IVG	3,66	63,6	3,52	66,3
		DIN	-	-	11 (sans lait)	50 (avec lait)
		RIVM	-	-	19	95
		UBM	3	74	3	74
		SHIME	-	-	1	83,5
		TIM	-	-	15	52
		<i>Tous les tests confondus</i>	0,05	74	0	95
Cadmium	7	SBET +/- PI	9	99	27,8	52,4
		BM/RS	-	-	0	51,4
		DIN	-	-	38 (sans lait)	90 (avec lait)
		RIVM	-	-	40	78
		UBM	8	86	5	55
		SHIME	-	-	5	7
		TIM	-	-	50	58
		<i>Tous les tests confondus</i>	8	99	ND	90
Chrome	6	PBET(Cr III)	36,6	71,5	5,1	54,7
		PBET (Cr VI)	17,7	45,8	-	-
		BM/RS total)	-	-	2,3	34
Zinc	2	UBM	33	48	10	23
Antimoine	2	UBM	1,1	18	0,4	18
Nickel	3	BM/RS	-	-	12	34
		PBET	-	7	6,4	32

Bac : Bioaccessibilité

*A noter que ce sont a priori des bioaccessibilités absolues qui ont été reportées ici. Peu d'auteurs ont calculé des bioaccessibilités relatives par rapport à une matrice de référence.*

A noter également que les études n'ayant analysé que des sols de référence ne sont pas reportées dans les tableaux annexés (ex : étude BARC (56)).

Les travaux reportés dans les publications avaient différents objectifs dont :

- développer un essai de bioaccessibilité et comparer les résultats en fonction de modifications des paramètres du protocole,
- comparer les résultats du test de bioaccessibilité à des données obtenus *in vivo*,
- comparer les résultats obtenus de différents essais de bioaccessibilité mis en œuvre,
- comparer les résultats pour des sols d'origines variées et des spéciations ou formes variées,
- identifier les paramètres du sol faisant varier les résultats de bioaccessibilité,
- corréler les résultats de bioaccessibilité avec des données obtenues après extractions séquentielles permettant de déterminer des concentrations sur différentes phases porteuses du sol.

#### IV.3.1.2 Principaux résultats de bioaccessibilité concernant les contaminants organiques

Concernant les molécules organiques, un nombre moins important d'études est disponible bien qu'un engouement croissant soit observable. Les procédures employées ont, en général, été plus ou moins adaptées, et ont au moins conduit à intégrer des aliments dans les protocoles de mesure de la bioaccessibilité.

Le Tableau 15 indique par famille de molécules organiques, les valeurs déjà observées (et présentées en ANNEXE 5). Les composés HAP sont les plus étudiés (12 études reportées). Quelques travaux sont reportés pour des PCBs, dioxines/furanes, pesticides organochlorés ou encore polybromodiphénylétérhères (dans des poussières domestiques pour ces derniers).

A l'instar des éléments inorganiques, le Tableau 15 indique les valeurs extrêmes rencontrées. Des détails sur les paramètres pouvant expliquer ces fortes variations sont fournies dans le chapitre IV-3.1.3 sur les paramètres sensibles de la mesure de la bioaccessibilité et dans l'ANNEXE 6.

**Tableau 15 : Variabilité des valeurs de bioaccessibilité des molécules organiques.**

Familles de molécules	Nombres de publications recensées et étudiées dans le cadre de ce contrat	Essais mis en œuvre	Phase gastrique (PG)		Phase intestinale (PI)	
			Bac minimale en %	Bac maximale en %	Bac minimale en %	Bac maximale en %
HAP	12	PBET	3,9	54,6	6,1	88,8
		DIN	-	-	10	90
		SHIME	-	-	0,1	21
		RIVM ou proche	4,9	21,8	2	50
		Forhest (tiré du RIVM)	-	-	10	60
Dioxines / Furanes	3	PBET ou proche	-	-	16	34
		Méthode Wiittsiepe	-	-	3 si ajout de lait, valeurs x 2 à 4	39
PCB	3	RIVM	-	-	15	79
		DIN	-	-	5	40
Pesticides organochlorés	2	Méthode Goni et al., 2006	-	-	2	86
		RIVM	-	-	57 (1 seule valeur)	
PBDE	1	DIN	-	-	10	42

Bac = Bioaccessibilité

#### IV.3.1.3 Paramètres sensibles dans la détermination de la bioaccessibilité

Les résultats des tests *in vitro* de bioaccessibilité par contaminant varient considérablement entre les différentes publications. Trois paramètres principaux semblent influencer les résultats de bioaccessibilité :

- Le test de bioaccessibilité utilisé
- Les caractéristiques du sol étudié
- Les caractéristiques du contaminant (nature, spéciation<sup>29</sup>/forme, concentration totale)

Ces items sont détaillés en ANNEXE 6, indépendamment les uns des autres. Néanmoins, il faut souligner que la spécificité d'une mesure de bioaccessibilité d'une substance dans un sol combinera nécessairement l'effet de ces quatre paramètres.

Parmi les caractéristiques du protocole des tests de bioaccessibilité qui ont une influence sur le résultat du test, **le pH des phases stomacale et intestinale** est celui qui a le plus d'impact (cf chapitre IV.2.2.3).

Pour les éléments inorganiques tels que plomb et cadmium (et dans une moindre mesure pour l'arsenic), la phase gastrique fournit des valeurs plus élevées que la phase intestinale, et ce quel que soit le test. Ceci est expliqué par les auteurs par des phénomènes de précipitation, notamment des carbonates à des pH proches de la neutralité (42).

Inversement, pour le cuivre et le nickel, nettement moins étudiés, des augmentations de bioaccessibilité entre la phase gastrique et la phase intestinale sont observées dans le test PBET mis en œuvre par Poggio *et al.*, qui expliquent cette observation par des complexations avec la glycine dans le segment stomacal (42).

Comme déjà évoqué dans le chapitre IV.2.2.3, **l'introduction d'aliments** dans les protocoles modifie également de manière importante les résultats de bioaccessibilité car cela modifie les conditions de pH gastrique faibles (<2) appliqués en condition à jeun. Les pH faibles permettent, en théorie, une dissolution plus importante des éléments inorganiques, néanmoins, l'introduction d'aliments engendre des résultats variables :

- un test IVG en présence d'aliments provoque une diminution de la bioaccessibilité gastrique du plomb (de 32 à 23 %) (86),
- des augmentations et diminutions de bioaccessibilité du plomb dans un sol sont observées en fonction des tests mis en œuvre en présence d'aliments (diminution dans les essais RIVM et TIM, augmentation dans les essais PBET et DIN) (68)

Ces variations sont liées à la composition de la nourriture. Par exemple des aliments riches en phosphore seraient à l'origine d'une diminution de la bioaccessibilité du plomb (confirmé par les résultats de Moseley *et al.* (90) qui montrent de très faibles bioaccessibilités (<1%) sur des sols amendés avec des produits riches en phosphore par rapport à des sols non amendés pour lesquels les bioaccessibilités varient de 40 à 100 %). Des aliments riches en calcium entraîneraient, au contraire, des augmentations de bioaccessibilité du plomb, cadmium et arsenic (ex : dans test DIN mis en œuvre par Oomen *et al.* (51)).

Pour les composés organiques, il semblerait que la présence d'aliment entraîne majoritairement une augmentation de la bioaccessibilité. Ceci comme déjà évoqué est lié à une meilleure solubilisation de ces molécules organiques hydrophobes en présence de nourriture notamment riche en graisses (52).

**Les caractéristiques physico-chimiques du sol** ont plus ou moins d'impact sur la valeur de bioaccessibilité du polluant étudié présent dans ce sol. En effet, la taille des particules de sol, les propriétés physico-chimiques telles que la teneur en matière organique, le pourcentage de sable et d'argile, le pH du sol ou encore la présence d'agents complexants (Mn, Fe, Si) peuvent modifier la valeur de bioaccessibilité. Néanmoins les résultats sont très variables :

- même si de façon générale, la bioaccessibilité et biodisponibilité des éléments inorganiques semblent être plus élevées avec les particules les plus fines (ex : démontrés par Ruby *et al.*, (76), Smith *et al.* (39)), ce n'est pas valable pour tous les sols. Girouard et Zagury (78) ont, par exemple, étudié la bioaccessibilité de l'arsenic dans les fractions < 90 et < 250 µm de 3

<sup>29</sup> Pour rappel, il s'agit de « spéciation » au sens large du terme, c'est-à-dire la répartition des éléments traces métalliques entre les diverses phases solides constitutives du sol. (38)

sols. Pour deux des sols, la bioaccessibilité dans la fraction < 90 µm est plus faible que dans la fraction < 250 µm (respectivement 17 contre 26 % et 24 contre 35 %). Selon les auteurs, ceci est lié, pour le sol concerné, à la concentration totale d'arsenic très élevée dans la fraction fine < 90 µm (par rapport à la fraction < 250 µm),

- la matière organique a tendance à séquestrer les contaminants organiques et inorganiques. La plupart des auteurs démontrent effectivement une corrélation négative entre les bioaccessibilités et la teneur en matière organique (ex Caboche (18), Roussel *et al.*(35)). Toutefois Pelfrene *et al.* (88) n'ont pas mis en évidence une telle corrélation : ces auteurs expliquent cela par la très forte teneur en plomb des sols étudiés (engendrant une saturation des sites de fixation),
- des auteurs ont tenté de mettre en évidence des corrélations statistiques entre des paramètres physico-chimiques des sols et les valeurs de bioaccessibilité. Cependant, il s'avère que pour un même polluant et un même test de bioaccessibilité, les paramètres statistiquement corrélés sont variables en fonction des études et des sols inclus dans chaque étude (cf chapitre IV.3.2 Modélisations).

Concernant les molécules inorganiques, l'historique de contamination du sol étudié influence les résultats de bioaccessibilité. Les sites avec « contamination » naturelle (sites miniers, fond géochimiques) présentent, en général, des éléments moins bioaccessibles que des sites avec des contaminations anthropiques (ex : liés à retombées atmosphériques de fonderie, d'incinérateurs). Ceci serait lié, d'une part, aux spéciations des éléments et aux phases porteuses des sols, et d'autre part, à l'âge de la pollution (les contaminations naturelles étant souvent plus anciennes, et moins « bioaccessibles » que les contaminations anthropiques, *via* l'apparition au fil du temps d'une forme chimique plus stable).

**La nature (ou spéciation/forme) du composé** en lui-même a un impact sur la valeur de bioaccessibilité. En effet, pour les composés inorganiques, les différentes formes chimiques d'un métal peuvent donner lieu à des valeurs de bioaccessibilité diverses. Par exemple, le plomb sous forme de carbonates (PbCO<sub>3</sub> cérosite) paraît plus bioaccessible que sous forme de sulfures (PbS) (76)(86).

La disponibilité environnementale d'une substance, à travers sa répartition au sein des phases porteuses des sols, est donc indirectement dépendante des paramètres physico-chimiques des sols comme, le pH, la température, l'alcalinité, la concentration en carbone organique dissous (COD), et la concentration en ions majeurs dans les sols (phosphates, carbonates, chlorures, sulfates ...).

Pour les composés organiques, les variations de bioaccessibilité sont souvent dues aux variations de la structure de la molécule au sein d'une même famille chimique (degré d'halogénéation, nombre de cycles). Il semble que la bioaccessibilité et donc la biodisponibilité soient influencées par les mêmes paramètres (forme chimique, taille des particules, caractéristiques physico-chimiques de sols), mais que le paramètre le plus sensible semble être la teneur en carbone organique dans le sol (COT) et l'affinité des substances étudiées pour cette matière organique (Koc).

Le Tableau 16 synthétise, 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 bioaccessibilité et biodisponibilité des métaux (18).

Les résultats d'une mesure de bioaccessibilité varient donc en fonction des caractéristiques du sol considéré, de la substance étudiée, et du test de mesure utilisé. La combinaison de ces trois éléments accentue la nécessaire spécificité de la mesure de bioaccessibilité au regard du site et de la problématique étudiés. Simultanément, l'interdépendance de ces trois éléments rend l'interprétation des résultats et leur comparaison extrêmement complexes.

**Tableau 16 : Impact de l'historique de contamination et de certains paramètres physico-chimiques du sol sur la biodisponibilité des éléments métalliques dans les sols (extrait de Caboche *et al.* (18))**

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

### IV.3.2. Modélisations

La valeur de biodisponibilité toxicologique peut être obtenue selon différentes voies :

- directement par la mise en œuvre de test *in vivo* (le plus souvent chez l'animal), cependant pour diverses raisons (éthiques, techniques, financières, etc.), ces tests sont difficiles à mettre en œuvre<sup>30</sup> ;
- indirectement *via* la mise en œuvre de mesures *in vitro* de bioaccessibilité qui ont l'intérêt de limiter les coûts et délais associés aux mesures *in vivo*. Néanmoins, en vue de valider l'utilisation d'un test *in vitro* de bioaccessibilité comme un moyen d'estimer la biodisponibilité d'un contaminant, la relation entre la biodisponibilité *in vivo* et la bioaccessibilité *in vitro* nécessite d'être établie. Cette corrélation est caractérisée ici sous le terme de « modélisation » puisqu'elle permet de déterminer mathématiquement la valeur de la biodisponibilité relative à partir d'une valeur de bioaccessibilité mesurée ;
- Indirectement à partir d'autres paramètres d'entrée tels que ceux sous-tendant la disponibilité environnementale de la substance. En effet, certains auteurs se sont intéressés à la prédiction de la bioaccessibilité des métaux à partir, non plus d'une mesure *in vitro*, mais de certains paramètres sensibles décrits précédemment. Deux courants se dégagent, une modélisation de la bioaccessibilité à partir des propriétés physico-chimiques du sol, et une autre à partir de la répartition du métal au sein des phases porteuses du sol (obtenue *via* des extractions séquentielles). Il faut souligner ici que, dans la grande majorité des cas, les éléments de la disponibilité environnementale d'une substance (caractéristiques des sols et de la substance) ne permettent pas d'estimer directement sa biodisponibilité. Une étape supplémentaire de modélisation sera alors nécessaire pour l'estimation de la biodisponibilité de la substance.

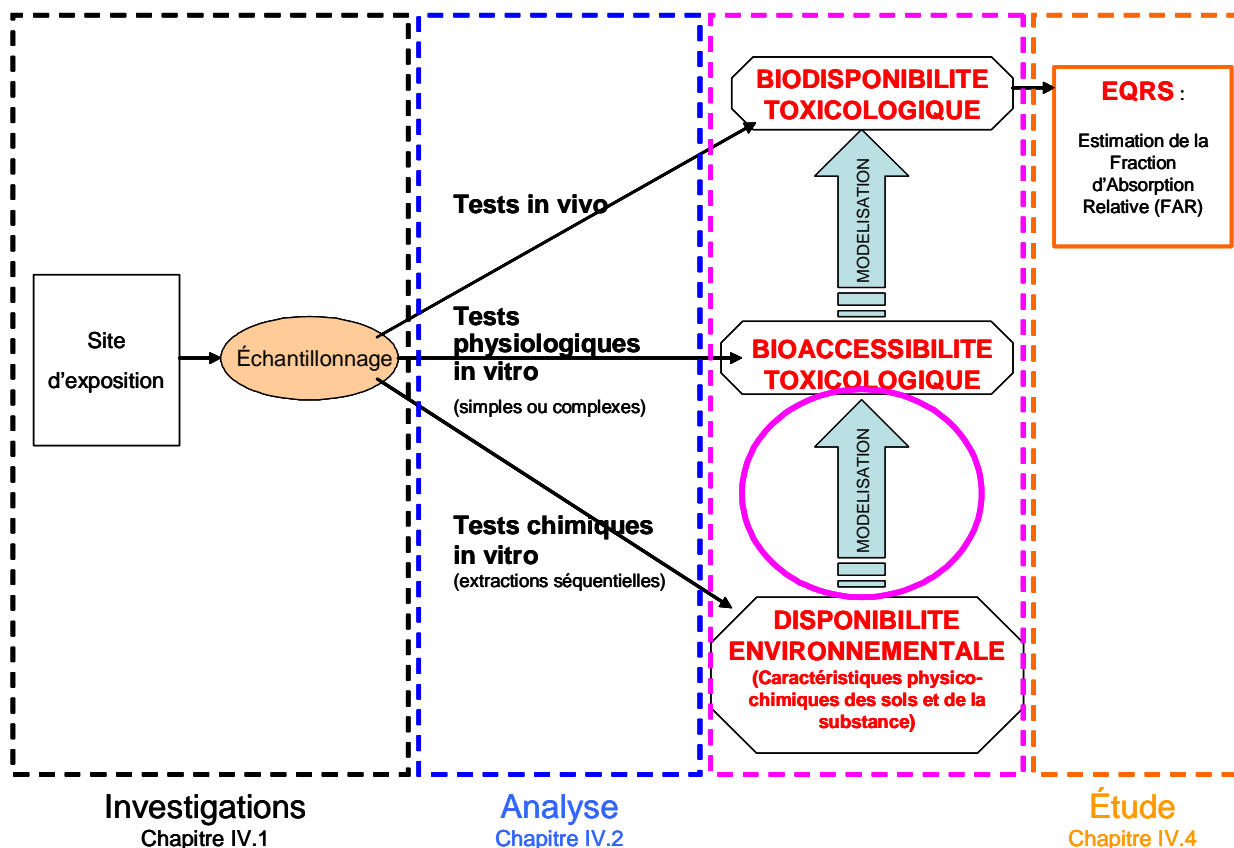
Ce chapitre va donc décrire l'ensemble des « modélisations » à disposition de l'évaluateur de risque lui permettant d'estimer la biodisponibilité de la substance qu'il étudie, en deux temps :

- dans un premier temps, l'estimation de la bioaccessibilité à partir des éléments déterminant la disponibilité environnementale de la substance étudiée ;
- puis, l'estimation de la biodisponibilité à partir de la bioaccessibilité mesurée et/ou estimée par modélisation.

---

<sup>30</sup> A noter que le fait d'utiliser des modèles animaux peut nécessiter l'application de facteurs d'incertitude pour l'obtention de données applicables à l'Homme

#### IV.3.2.1 Modélisation de la bioaccessibilité



##### i) Modélisation de la bioaccessibilité à partir des caractéristiques du sol

Comme évoqué précédemment, différents paramètres du sol ont un impact sur la quantité de contaminant bioaccessible. Certains auteurs ont alors montré un lien entre des paramètres du sol et la valeur de bioaccessibilité, et plusieurs équations ont ainsi été obtenues par régression linéaire. Ces équations semblent pouvoir permettre, sous réserve d'une validation par rapport à des résultats de tests *in vitro* et/ou *in vivo*, de modéliser la bioaccessibilité sans passer par une étape expérimentale de simulation de la digestion.

Ces équations sont présentées dans le Tableau 17. Elles concernent uniquement sept métaux, aucune équation similaire n'ayant été trouvée dans la littérature, lors de cette recherche, pour des composés organiques.



**Tableau 17 : Equations reliant les propriétés du sol à la bioaccessibilité, par contaminant**  
(%BA = bioaccessibilité en pourcentage de la concentration totale du contaminant)

Contaminant	Publication	Test	Equation	Coefficient de corrélation $r^2$
Plomb	Roussel <i>et al.</i> 2010 (35)	UBM		
	Phase gastrique		$BA \text{ (mg/kg)} = 171,7 - 1,09 \times CaCO_3 - 225,9 \times Fe + 0,68 \times Pb \text{ total}$	$r^2 = 0,97$
	Phase gastro-intestinale		$BA \text{ (mg/kg)} = 1020,6 - 32,6 \times N \text{ total} - 131,1 \times pH + 0,39 \times Pb \text{ total}$	$r^2 = 0,95$
	Caboche <i>et al.</i> 2010 (36)	UBM		
	Sol minier		$\%BA = -18.9 \times CEC + 1.14[Mn] - 2.82[Fe] - 3.6 \times OM$	$r^2 = 0.81$
	Sol de fonderie		$\%BA = -2.2 \times clay + 4.9[P] + 4.6[Mn]$	$r^2 = 0.73$
Cadmium	Pelfrène <i>et al.</i> 2010 (88)	UBM		
	Phase gastrique		$\%BA = 56.6 - 0.5 CaCO_3 \text{ tot} - 101.7 \text{ free Al oxide} + 0.64 Pb \text{ total}$	$r^2 = 0.82$
	Phase gastro intestinale		$\%BA = 60.4 - 3.95 Fe \text{ tot} + 25.1 Cd \text{ total} - 0.14 Zn \text{ total}$	$r^2 = 0.64$
	Poggio <i>et al.</i> 2009 (42)	PBET modifié		
	Phase gastrique		$\%BA = -1.5 \times OM - 1.1 \times clay + 0.31 \times Pb \text{ PST} + 12.7$	$r^2 = 0.53$
	Phase intestinale		$\%BA = 0.51 \times pH + 0.35 \times OM + 0.03 \times Sand + 0.02 Pb \text{ PST} - 3.9$	$r^2 = 0.49$
	Roussel <i>et al.</i> 2010 (35)	UBM		
	Phase gastrique		$BA \text{ (mg/kg)} = 1,23 - 2,25 \times Fe + 0,79 \times Cd \text{ total} - 1,02 \times 10^{-3} \times Pb \text{ total}$	$r^2 = 0,98$
	Phase gastro-intestinale		$BA \text{ (mg/kg)} = 0,68 - 0,55 \times N \text{ total} + 0,39 \times Cd \text{ total}$	$r^2 = 0,87$
	Pelfrène <i>et al.</i> 2010 (88)	UBM		
	Phase gastrique		$\%BA = -0.96 + 0.0025 \text{ sand} + 2.33 \text{ free Al oxide} + 0.61 Cd \text{ total}$	$r^2 = 0.83$
	Phase gastro intestinale		$\%BA = 0.98 + 0.0013 \text{ sand} - 0.0051 OM + 0.24 Cd \text{ total}$	$r^2 = 0.72$

Contaminant	Publication	Test	Equation	Coefficient de corrélation $r^2$
Arsenic	Sarkar <i>et al.</i> , 2007 (91) Phase gastrique	IVG	%BA IVGS = $250.9 + 0.15a - 3.36b - 40.5c - 0.34d + 0.66e$	$r^2 = 0.85$
	Phase intestinale		%BA IVGIA = $-11 + 0.14a - 1.57b - 0.15d + 0.044e$ a : P total, b : contenu en argile, c : pH, d : EC, e : Ca+Mg total	$r^2 = 0.86$
	Lu <i>et al.</i> , 2010 (41) Phase gastrique	IVG	%BA = $2.78 \text{ pH} + 0.07 \text{ SOM (g/kg)} - 11.74$	$r^2 = 0.451$
	Phase intestinale		%BA = $2.64 + 0.027 \text{ SOM (g/kg)} - 0.13 \text{ silt (\%)} - 0.097 \text{ As (mg/kg)}$	$r^2 = 0.604$
	Juhasz <i>et al.</i> , 2007 (92)	SBET	Tous les sols confondus : %BA = $\text{As total (0.409)} - \text{Fe total (4.579)} + 67.85$	$r^2 = 0.955$
	Yang <i>et al.</i> , 2002 (93)	PBET	%BA = $11.3 (\text{pH}) - 30.5 (\log \text{Fe})$	Pas de donnée
Nickel	Tang <i>et al.</i> , 2007 (18)	Non renseigné	%BA = $7,25 \text{ pH} + 0,158 [\text{As}]$	$r^2 = 0.79$
	Klinck <i>et al.</i> , 2005 (8)	PBET	%BA = $457 + 0,14 [\text{As}] - 9,57 [\text{Fe}]$	$r^2 = 0.92$
Chrome III	Poggio <i>et al.</i> , 2009 (42) Phase gastrique	PBET modifié	%BA = $0.58\text{xpH} + 0.41\text{xOM} + 0.01\text{sand} + 0.02\text{clay} + \text{Ni PST} - 1.6$	$r^2 = 0.22$
	Phase intestinale		%BA = $0.38\text{xpH} + 0.21\text{xOM} - 0.01\text{sand} + 0.01 \text{Ni PST} + 9.8$	$r^2 = 0.33$
Chrome III	Onweremadu <i>et al.</i> , 2007 (94)	PBET	%BA = $17.6 + 0.5 \text{ clay} - 4.1 \text{ TOC}$ %BA = $17.6 + 6.3\text{pH} + 7.1 \text{ CEC} - 8.2 \text{ TIC}$ TOC : carbone organique total TIC : carbone inorganique total CEC : capacité d'échange cationique	$r^2 = 0.8$
	Stewart <i>et al.</i> 2003 (3)	PBET modifié	%BA = $16.02 + 0.426 \text{ argile} - 9.56 \text{ CIT}$ CIT : carbone inorganique total	Pas de donnée
Zinc	Roussel <i>et al.</i> 2010 (35) Phase gastrique	UBM	BA (mg/kg) = $-54,5 - 0,41 \times \text{Pb total} + 0,80 \times \text{Zn total}$	$r^2 = 0,97$
	Phase gastro-intestinale		Ba (mg/kg) = $168,4 + 0,41 \times \text{Zn total} - 1,88 \times \text{clay}$	$r^2 = 0,97$
	Pelfrène <i>et al.</i> , 2010 (88) Phase gastrique	UBM	%BA = $-39.3 - 0.61 \text{ OM} + 0.49 \text{ Zn total}$	$r^2 = 0.93$
	Phase gastro intestinale		%BA = $-2.62 - 0.12 \text{ CaCO}_3 \text{ tot} - 21.8 \text{ P}_2\text{O}_5 - 0.24 \text{ OM} - 5.07 \text{ Cd tot} + 0.23 \text{ Zn total}$	$r^2 = 0.91$
	Poggio <i>et al.</i> , 2009 (42) Phase gastrique	PBET modifié	%BA = $1.4\text{xOM} + 0.07\text{sand} + 0.21\text{xZn PST} - 15.7$	$r^2 = 0.42$
	Phase intestinale		%BA = $1.3\text{xOM} + 0.11\text{sand} + 0.19\text{xZn PST} + 19.4$	$r^2 = 0.34$

Contaminant	Publication	Test	Equation	Coefficient de corrélation $r^2$
Cuivre	Poggio <i>et al.</i> , 2009 (42) Phase gastrique	PBET modifié	$\%BA = -2.1 \times OM - 0.65 \text{clay} + 0.53 \text{ Cu PST} - 1.4$	$r^2 = 0.32$
	Phase intestinale		$\%BA = -0.14 \times OM - 0.68 \text{clay} + 0.63 \text{ Cu PST} - 8.0$	$r^2 = 0.60$

PST: pseudototal

OM : matière organique

BA : bioaccessibilité

[ ] concentrations

Selon les contaminants et les équations, les coefficients de corrélation  $r^2$  varient de 22% à 95% montrant ainsi des corrélations relativement variables en termes de robustesse.

Poggio *et al.* (42) montrent ainsi que la bioaccessibilité du plomb, nickel, zinc, et cuivre est fonction de la matière organique, du pH, du pourcentage d'argile /sable et de la concentration totale dans les sols de type urbain. Cependant, les auteurs précisent que le modèle développé n'est valable que pour les sols de l'étude. Une validation de ce modèle de prédiction nécessiterait d'étudier d'autres sols provenant d'autres sites présentant des caractéristiques différentes (42).

Pour un même contaminant, et des auteurs différents, les équations ne mettent pas en évidence les mêmes paramètres sensibles de la corrélation entre bioaccessibilité et paramètres physico-chimiques. De plus, il est important de noter que les paramètres sensibles de la corrélation peuvent varier d'un sol à l'autre.

Ces résultats tendent à montrer que, même si des corrélations significatives sont parfois mises en évidence, elles semblent ne pas pouvoir être généralisées à l'ensemble des sols, même de caractéristiques similaires. Ceci démontre la difficulté de prédire la bioaccessibilité des contaminants pour l'ensemble des sites contaminés à partir des paramètres physico-chimiques des sols.

## ii) Modélisation de la bioaccessibilité à partir d'un test d'extraction séquentielle.

Dans sa thèse, Caboche (18) évoque les corrélations significatives entre la bioaccessibilité de certains métaux (plomb, cadmium, arsenic) et les résultats des extractions séquentielles (Cf. Tableau 18).

**Tableau 18 : Matrice de corrélation Pearson (r) entre la bioaccessibilité de certains métaux (plomb, cadmium, arsenic et antimoine) et les phases d'extractions séquentielles (d'après Caboche (18))**

	Fraction soluble	Fraction échangeable	Fraction acido-soluble	Ox-Mn	Ox-Fe amorphe	Ox-Fe crist	Sulfures	MO	Fraction résiduelle
BA Plomb (%)	0,47	<b>0,74</b>	<b>0,80</b>	0,14	-0,10	<b>-0,69</b>	<b>-0,87</b>	0,17	<b>-0,82</b>
BA Arsenic (%)	<b>0,85</b>	<b>0,81</b>	<b>0,74</b>	-0,33	0,22	-0,39	0,13	-0,47	<b>-0,65</b>
BA Cadmium (%)	<b>0,79</b>	<b>0,78</b>	<b>0,86</b>	-0,04	0,10	<b>-0,59</b>	<b>-0,89</b>	-0,30	<b>-0,81</b>
BA Antimoine (%)	0,08	0,12	0,21	-0,11	-0,15	-0,45	-0,56	0,23	-0,39

Les corrélations significatives sont notées en gras.

D'une façon générale, la bioaccessibilité du plomb, de l'arsenic et du cadmium dans les sols est significativement et positivement corrélée à la concentration de ces mêmes substances au sein des fractions échangeables et acido-solubles (carbonates). A l'inverse, la bioaccessibilité du plomb, de

l'arsenic et du cadmium dans les sols est significativement et négativement corrélée à la concentration de ces mêmes substances au sein des fractions résiduelles. La faible variation de la bioaccessibilité de l'antimoine peut s'expliquer par le fait que l'antimoine est majoritairement lié à des phases porteuses du type oxy-hydroxydes de fer, sulfures et sur les constituants réfractaires de la fraction résiduelle (18). Ces résultats corroborent les données de la littérature relatives à l'influence de la spéciation des éléments métalliques sur leur bioaccessibilité.

Selon Caboche, la distribution des contaminants au sein des différentes phases porteuses du sol est un paramètre plus robuste que les paramètres physico-chimiques pour expliquer la variation de la bioaccessibilité dans les sols (18). Ceci peut s'expliquer par le fait que la distribution géochimique dépend et englobe de nombreux paramètres, et notamment les paramètres physico-chimiques (18).

Sur ces bases, Caboche *et al.* (36) ont mis au point, en 2010, un modèle d'estimation de la valeur de bioaccessibilité en fonction des quantités retrouvées dans les fractions issues d'un test d'extraction séquentielle. Les auteurs ont déterminé une équation en estimant la bioaccessibilité issue de chaque fraction d'extraction par le test UBM. Pour cela, ils ont réalisé une mesure de bioaccessibilité sur le résidu obtenu après chaque étape d'extraction. Cette mesure sur chaque fraction extraite a été étudiée au regard de la bioaccessibilité totale du sol, mesurée par ailleurs, dans l'objectif de déterminer des facteurs de pondération pour chaque séquence d'extraction. L'équation qui en résulte est la suivante :

$$\text{Pb bioaccessible (\%)} = 1,02 \times \% \text{ Pb soluble} + 1 \times \% \text{ Pb échangeable} + 0,69 \times \% \text{ Pb acide-soluble} + 0,39 \times \% \text{ Pb ox-Mn} + 0,1 \times \% \text{ Pb AmorphOx-Fe} + 0,07 \times \% \text{ Pb crystOx-Fe} + 0,04 \times \% \text{ Pb sulphides} + 0,35 \times \% \text{ Pb matière organique}$$

Une comparaison des résultats de bioaccessibilité issus directement du test *in vitro* (bioaccessibilité mesurée) avec ceux issus de l'équation précédente (bioaccessibilité calculée) a été réalisée. Cette comparaison (bioaccessibilité mesurée / calculée) a conduit à l'établissement d'une corrélation avec un  $r^2=0,97$ . A noter néanmoins que la grande robustesse de la corrélation (97%) est peut-être fondée sur le fait que les sols qui ont servi à l'élaboration de l'équation sont les mêmes que ceux qui ont été utilisés pour la comparaison et que, par ailleurs, les deux variables sont dépendantes l'une de l'autre. En effet, les déterminants de l'équation ont été obtenus, indirectement, à partir de la bioaccessibilité totale mesurée (voir plus haut).

D'autres auteurs tels que Pelfrène *et al.* (88), ont mis en évidence une corrélation significative entre la bioaccessibilité d'un contaminant et la répartition des éléments sur les phases porteuses du sol, grâce à des extractions séquentielles (Cf. Tableau 19).

Dans le cas de Pelfrène *et al.* (88), et à la différence de l'étude de Caboche *et al.* (18), il faut souligner que l'équation a été obtenue à l'aide d'une régression linéaire à partir des résultats du test *in vitro* de bioaccessibilité sur le sol étudié et des résultats d'extraction séquentielle (fraction du polluant dans chaque phase), et non pas par mesure réelle de la bioaccessibilité dans chaque phase d'extraction.

Ces équations pourraient permettre une modélisation de la bioaccessibilité à partir d'une extraction séquentielle purement chimique. Toutefois, il apparaît un faible nombre d'équations disponibles dans la littérature scientifique. En outre, malgré une similarité logique, des paramètres les plus sensibles tels que la fraction échangeable et soluble dans l'acide, les équations varient notablement d'un auteur à l'autre.

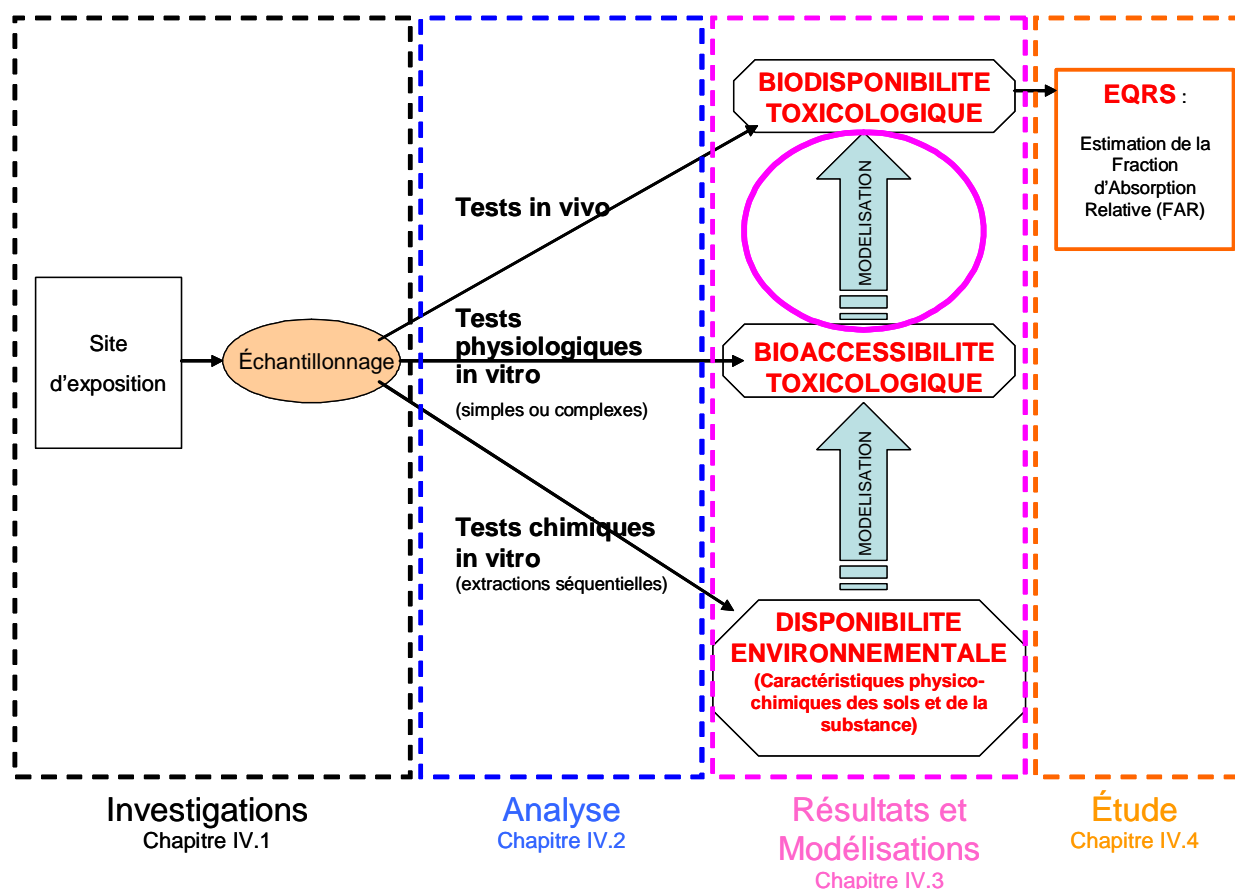
**Tableau 19 : Relation entre la bioaccessibilité *in vitro* (test UBM) et les fractions extraites par extractions séquentielle (88)**

Contaminant	Compartiment physiologique étudié	Equation	Coefficient de corrélation $r^2$
Plomb	Phase gastrique	$Pb \text{ bioacc} \approx 2,75 [Pb]_A + 0,69 [Pb]_B - 2,58 [Pb]_D - 17,5$	$r^2=0.86$
	Phase gastro intestinale	$Pb \text{ bioacc} \approx 2,17 [Pb]_A + 0,20 [Pb]_B - 5,54$	$r^2=0.58$
Cadmium	Phase gastrique	$Cd \text{ bioacc} \approx 0,82 [Cd]_A + 0,74 [Cd]_B + 0,78$	$r^2 = 0.79$
	Phase gastro intestinale	$Cd \text{ bioacc} \approx 0,65 [Cd]_A + 0,84$	$r^2 = 0.79$
Zinc	Phase gastrique	$Zn \text{ bioacc} \approx 0,83 [Zn]_A + 0,26 [Zn]_B - 0,41 [Zn]_R - 34,4$	$r^2=0.93$
	Phase gastro intestinale	$Zn \text{ bioacc} \approx 0,37 [Zn]_A + 0,26 [Zn]_D - 0,41 [Zn]_R - 4,79$	$r^2=0.93$

A : fraction échangeable et soluble dans l'acide ; B : fraction réductible ; D : fraction oxydable ; R : fraction résiduelle

### IV.3.2.2 Modélisation de la biodisponibilité

#### i) Modélisation de la biodisponibilité à partir de la bioaccessibilité mesurée *in vitro*



Comme vu dans le chapitre IV.2.2.4, l'utilisation des résultats issus des tests *in vitro* de bioaccessibilité pour estimer la biodisponibilité est basée sur l'hypothèse que la bioaccessibilité est l'étape limitante dans le processus de biodisponibilité. Cela signifie que, pour un sol donné, bioaccessibilité et biodisponibilité sont linéairement corrélées.

C'est donc l'ensemble des résultats des corrélations *in vivo/in vitro* qui peut permettre, *via* les équations obtenues par régression linéaire énoncés par les auteurs, de modéliser la biodisponibilité relative (RBD) à partir des résultats de bioaccessibilité *in vitro*. Ces équations ont été compilées dans le Tableau 9 (cf chapitre IV.2.2.4).

L'utilisation des équations de corrélation est donc une piste pertinente pour évaluer la biodisponibilité relative d'un contaminant (BD rel), néanmoins il est essentiel de s'assurer au préalable que la corrélation *in vivo/in vitro* est de bonne qualité *via* une analyse multicritère appropriée (cf chapitre IV.2.2.4) :

- un coefficient de corrélation significatif ( $r^2 > 0,6$ ) ;
- la corrélation doit être obtenue pour une gamme de valeurs la plus étendue possible avec des valeurs correctement réparties tout le long de la droite de corrélation ;
- une valeur de pente non significativement différente de 1 (en privilégiant une étude R/R, évitant ainsi tout biais d'interprétation).
- la répétabilité au sein du même laboratoire doit être  $\leq 10\%$  RSD (Relative Standard Deviation)
- la reproductibilité inter laboratoire doit être  $\leq 20\%$ .

Il faut toutefois rappeler quelques éléments, déjà mis en évidence au chapitre IV.2.2.4:

- Actuellement, il existe relativement peu d'équations de corrélation dans la littérature scientifique, notamment pour un même test et une même substance, ce qui limite l'analyse critique des équations disponibles ;
- la valeur de bioaccessibilité relative *in vitro* est potentiellement inférieure à la valeur de la biodisponibilité relative *in vivo*. Dans les études de corrélation *in vivo/in vitro*, il apparaît qu'en se basant uniquement sur la linéarité et la significativité de la corrélation, des modèles peuvent être considérés comme valides alors qu'ils fournissent, par exemple, des valeurs de bioaccessibilité largement inférieures aux valeurs de biodisponibilité relative. A ce titre, concernant le test UBM, qui apparaît, selon Caboche (18), comme significativement corrélé au test de biodisponibilité *in vivo*, l'étude BARC 2011 (essai inter laboratoire) indique que la bioaccessibilité (absolue et relative) du plomb et de l'arsenic mesurée par le test UBM est inférieure à la biodisponibilité mesurée par les tests *in vivo* sur le porc (56) ;
- Pour une même substance, un même test (*in vitro*) et un même modèle animal (*in vivo*), on constate une variabilité des équations en fonction des études (cf exemple avec le test SBRC dans le Tableau 20).

**Tableau 20 : Comparatif des équations de corrélation obtenues avec le test SBRC**

Substance	Test <i>in vitro</i> / Test <i>in vivo</i>	R/R ou A/R	Auteur (publications)	Equation dans la phase gastrique (PG)	$r^2$ <i>Phase Gastrique</i>
Arsenic	SBRC / porc	A/R	Juhasz <i>et al.</i> , 2009 (82)	RBD (%) = 0,992 x BAc (%) + 1,656	0,754
			Medlin, 1995 reporté par Caboche, 2009, (18)	RBD (%) = 2,273 x BAc (%) + 12,955	0,4
			US-EPA, 2005 (27)(Supplément 69)	RBD (%) = 0,3538 x BAc (%) + 0,234	0,173
Plomb			Juhasz <i>et al.</i> , 2009 (84) et 2010 (44)	RBD (%) = -0,18 x BAc (%) + 25,26*	0,12
			Medlin, 1995 reporté par Caboche, 2009 (18)	RBD (%) = 1,149 x BAc (%) - 7,816	0,85
			Drexler et Brattin, 2007 (59) US-EPA, 2009 (85)	RBD (%) = 0,878 x BAc (%) - 0,028	0,924
		R/R	Grøn <i>et al.</i> , 2005 (19)	RBD (%) = 1,449 X BAc (%) – 0,406	0,630

R/R : bioaccessibilité *in vitro* relative et biodisponibilité *in vivo* relative

A/R : bioaccessibilité *in vitro* absolue et biodisponibilité *in vivo* relative

RBD : Biodisponibilité relative

BAc : bioaccessibilité (absolue si équation A/R, ou relative si équation R/R)

Les équations de corrélation *in vivo/in vitro* apparaissent comme la méthode la plus fiable pour modéliser la biodisponibilité relative d'un contaminant. Néanmoins, compte tenu de la variabilité des équations obtenues, il est essentiel d'avoir à l'esprit que ces estimations demeurent empreintes d'incertitudes. Ainsi, et dans une démarche sécuritaire, l'équation engendrant une valeur de biodisponibilité relative la plus élevée peut être privilégiée. Par ailleurs, plusieurs droites de corrélation pouvant être obtenues selon que l'on utilise les données issues de la phase gastrique ou celles de la phase gastro-intestinale, la phase montrant la meilleure corrélation avec les données *in vivo* est à privilégier (12)(147).

## **ii) Modélisation de la biodisponibilité à partir des caractéristiques des sols**

Une étude du laboratoire Lowney *et al.* (80) et une étude de Juhasz *et al.* (83) ont élaboré une équation permettant d'évaluer directement la biodisponibilité relative de l'arsenic à partir des caractéristiques physico-chimique des sols.

**Tableau 21 : Equations rencontrées dans la littérature pour la modélisation de la biodisponibilité relative (RBA) à partir des caractéristiques des sols**

Substance	Auteur	Equation	Coefficient de corrélation $r^2$
As	Juhasz <i>et al.</i> , 2007 (83)	$BD^* \text{ (mg/kg)} = 11,31 + 0,678 \times [As]_{tot} \text{ (mg/kg)} - 4,368 \times [Fe]_{tot} \text{ (g/kg)}$	0,72
As	Lowney <i>et al.</i> , 2006 (80)	$RBD = 0,20 - 0,045 \times COT + 0,00002 \times [FeO]_{tot} - 0,00009 \times [Cu]_{tot} - 0,00003 \times [Zn]_{tot}$	NR

NR : Non renseigné

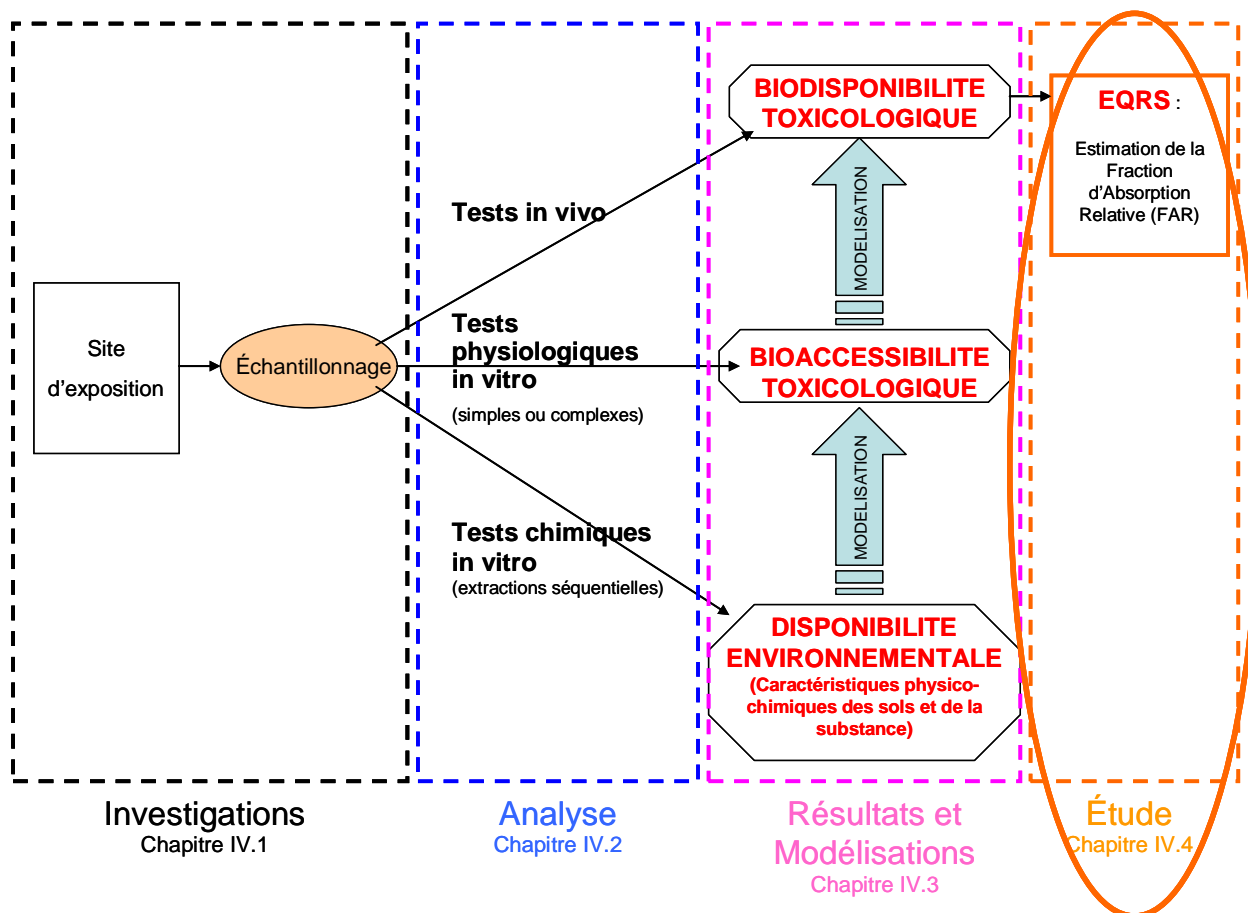
\* La publication n'étant pas très explicite, il est supposé ici qu'il s'agit d'une biodisponibilité relative.

Toutefois, selon les sols inclus dans les études et les polluants, à l'instar de la modélisation de la bioaccessibilité sur la base des paramètres physico-chimiques du sol, il est fortement probable que les modélisations de la biodisponibilité à partir des paramètres physico-chimiques du sol soient également très variables (corrélations significative ou non, équations différentes, etc.).

Enfin, Marchner *et al.* (104) font *a priori* partie des seuls à avoir étudié la corrélation entre les résultats des extractions séquentielles et la biodisponibilité obtenue *in vivo* (porc). Ils ont effectivement démontré que la biodisponibilité du plomb était hautement corrélée avec le plomb contenu dans la fraction facilement réductible liée à des oxydes de manganèse issue des extractions séquentielles (fraction III). La corrélation est d'autant plus significative lorsqu'on étudie uniquement les reins et le foie ( $r = 0,99$  et  $0,95$  respectivement), en effet, la corrélation avec la biodisponibilité totale est moindre ( $r = 0,92$ ), du fait que la biodisponibilité du plomb dans les os n'est pas liée à la fraction III.



## IV-4. Etude



### IV.4.1. Généralités

Comme vu précédemment, les notions de biodisponibilité/bioaccessibilité toxicologiques visent des études relatives à la santé humaine (étude d'exposition, grille de calcul « IEM », EQRS, volet sanitaire d'étude d'impact). L'intégration de ces notions doit toutefois se faire de façon rigoureuse, c'est-à-dire de façon conjointe dans l'estimation de la dose d'exposition de la cible étudiée et celle de la dose d'exposition de référence.

Dans le contexte d'une évaluation des risques sanitaires associés à l'ingestion de sol, la biodisponibilité *relative* est le facteur qui permet d'ajuster de façon pertinente le calcul de la dose d'exposition en fonction de la matrice « sol » étudiée, au regard de la matrice de référence représentée par la matrice utilisée dans l'étude clé pour l'élaboration de la Valeur Toxicologique de Référence (VTR).

L'utilisation d'un facteur correctif tel que la biodisponibilité relative permet ainsi d'estimer le niveau de risque réellement encouru par les futurs usagers d'un site pollué, par ingestion de sol, en ajustant la relation dose-effet théorique de la substance obtenue *via* la matrice de référence, à la matrice réellement ingérée (les sols).

Lorsque que la biodisponibilité dans les sols est comparée à la biodisponibilité obtenue lors de l'étude de référence pour la construction de la VTR, il est rare que la biodisponibilité relative soit supérieure à 100% (17). En effet, la matrice de référence est souvent choisie en vue de l'obtention d'une biodisponibilité maximale.

La norme ISO/TS 17924 : 2008 présente la mesure de la biodisponibilité relative ou Fraction d'Absorption Relative (FAR) comme une « *démarche plus pratique* ». Cette norme précise néanmoins qu'il est possible de rencontrer des valeurs de FAR supérieures à 100%.

Le facteur de biodisponibilité relative (FAR) est introduit dans les calculs de risque (4)(12), selon la méthode suivante.

Pour les risques non cancérogènes :

$$QD_{\text{ajusté}} = \frac{DJE \times BD_{\text{sol}}}{VTR \times BD_{\text{VTR}}} = \frac{DJE}{VTR} \times FAR$$

Avec : QD : Quotient de Danger

DJE : Dose Journalière d'Exposition

VTR : Valeur Toxicologique de référence (pour les effets à seuil de dose)

BD<sub>sol</sub> : biodisponibilité dans les sols étudiés

BD<sub>VTR</sub> : biodisponibilité dans matrice de référence (associée à l'établissement de la VTR)

FAR : facteur d'absorption relative

Pour les risques cancérogènes :

$$ERI = DJE \times FAR \times CSF_{\text{étude}}$$

Avec : ERI : Excès de Risque Individuel

CSF : Cancer Slope Factor (Valeur Toxicologique de référence pour les effets sans seuil de dose)

Il est également proposé d'utiliser le facteur d'absorption relative pour réévaluer directement les seuils de réhabilitation (1/FAR) (12).

#### **IV.4.2. Etat des connaissances en matière de méthodologie d'intégration des notions de bioaccessibilité/biodisponibilité dans les études sanitaires**

##### **IV.4.2.1 Méthodologies existantes**

Plusieurs démarches itératives ont été rencontrées dans la littérature (1)(4)(12)(16)(24). Les méthodes proposées concernent essentiellement les métaux et métalloïdes, il y a peu d'informations sur les composés organiques. Ces méthodes sont toutes présentées sous la forme de logigrammes. Elles sont listées en ANNEXE 7.

Une synthèse de ces différentes démarches est présentée ici.

Dans un premier temps, la pertinence de mettre en place une étude de bioaccessibilité est étudiée. A cet effet, plusieurs points sont abordés :

- l'ingestion de sol est-elle une voie prépondérante du risque (1)(12)(16)(20)(21) ?
- la valeur de biodisponibilité du contaminant sous sa forme rencontrée sur le site est-elle *a priori* inférieure à la valeur par défaut (4)(16)(20) ?
- l'utilisation d'une biodisponibilité spécifique au site aura-t-elle une conséquence importante sur les réhabilitations envisagées (diminution des coûts et des moyens mis en œuvre notamment dans le cas de site de taille importante) (16)(20)(21) ?
- le coût (16)(20)(21)(22)(23)(24) et le temps nécessaire (24) à l'obtention des données de bioaccessibilité/biodisponibilité sont-ils inférieurs au coût de réhabilitation *a priori* et compatibles avec les délais imposés par l'étude de risque ?

Une première étape de calcul à l'aide d'une valeur par défaut est souvent réalisée. Selon les méthodes, cette valeur pourra être 100% dans une approche sécuritaire ou bien des valeurs inférieures basées sur des caractéristiques spécifiques au site (teneur en matière organique (13) ou spéciation des métaux (16)). Si, lors de cette étape préliminaire, aucun risque n'est mis en évidence, il n'est alors pas nécessaire de poursuivre la démarche d'intégration d'une bioaccessibilité spécifique au site. En revanche, dans les méthodologies recensées, si le risque est inacceptable, l'utilisation du FAR est suggérée.

Les principales divergences d'approche sont les suivantes :

- certaines méthodes n'impliquent pas la mise en place de l'étape préliminaire de biodisponibilité relative par défaut et se fondent directement sur l'utilisation de la bioaccessibilité mesurée *in vitro* ;
- utilisation de données bibliographiques (tout ou en partie) (16)(13)(25) dans certaines études, et utilisation des seules données expérimentales (4)(24) dans d'autres études ;
- il n'est pas toujours spécifié que la biodisponibilité de référence doit être celle issue de l'étude de toxicité (utilisation de RBD ou FAR).

#### IV.4.2.2 Utilisation de données bibliographiques

Dans le questionnaire envoyé aux autorités locales par l'Agence de l'Environnement du Royaume-Uni, 14% des personnes interrogées avaient répondu que certaines des évaluations de risque réalisées avaient été effectuées en intégrant une valeur de bioaccessibilité issue de la littérature (95). Cependant la bioaccessibilité étant dépendante des propriétés physico-chimiques du sol et de celles du métal considéré, d'autres auteurs suggèrent qu'une bioaccessibilité doit être associée à un contaminant et à un sol particulier, d'où la recommandation de réaliser un test physiologique de mesure de la bioaccessibilité absolue du contaminant étudié dans le sol considéré.

Une étude réalisée en 2007 a porté sur l'intérêt de prendre en compte la biodisponibilité *a minima* dans les études de risque sanitaire, en se basant en partie sur des données bibliographiques (16). Pour ce faire, 10 études réalisées antérieurement (sans intégration de la notion de biodisponibilité) ont été sélectionnées, et le modèle hybride probabiliste-possibiliste (HyRisk du BRGM) a été utilisé en vue d'étudier, après intégration de la notion de biodisponibilité, la distribution de probabilité de l'événement suivant : « le risque est inférieur au seuil de référence ». Dans la majorité des cas, en l'absence de données spécifiques de spéciation/forme, la méthode ponctuelle a été utilisée (13 calculs sur 22). Sur les 50 calculs réalisés (tout risque et toutes cibles confondues), 9 résultats initialement supérieurs aux valeurs de référence sont passés sous les seuils de risque. La prise en compte d'une distribution de la concentration totale entraîne, à elle seule, une diminution sous le seuil pour 7 des 9 résultats. La biodisponibilité (bibliographique) a donc eu un impact réel pour 2 résultats sur 50 calculs (2 études sur 10).

D'autres auteurs ont suggéré l'utilisation de valeurs par défaut issues de leur recherche expérimentale :

- Selon le RIVM (13), des valeurs de biodisponibilité relative par défaut sont proposées, pour le plomb, en fonction de la teneur en matière organique des sols (cf Tableau 22). Les données en gras sont celles retenues par le RIVM comme FAR par défaut à introduire dans les évaluations des risques sanitaires.

**Tableau 22 : Valeur de biodisponibilité en fonction du taux de matière organique des sols pour le plomb, selon le RIVM**

Percentile	Matière organique < 20%		Matière organique > 20%	
	Valeur de bioaccessibilité par défaut (%)	Valeur de biodisponibilité relative par défaut (%)	Valeur de bioaccessibilité par défaut (%)	Valeur de biodisponibilité relative par défaut (%)
P50	20,4	41	10,9	22
P80	43,7	<b>87</b>	20,8	<b>42</b>
P85	43,9	<b>88</b>	21,1	<b>42</b>
P90	48,6	<b>97</b>	21,4	<b>43</b>
P95	59,9	<b>120</b>	23,3	<b>47</b>

Les valeurs de bioaccessibilité par défaut ont été établies sur la base de :

- 25 mesures pour les sols dont la teneur en matière organique est < 20%
- 18 mesures pour les sols dont la teneur en matière organique est > 20%

Les valeurs de biodisponibilité relative ont été établies sur la base de l'estimation suivante :  
 Biodisponibilité relative = 2 x Bioaccessibilité (absolue) du plomb dans les sols (cf chapitre IV-2.2.3)

- Selon l'US-EPA (26)(27), des valeurs de biodisponibilité relative par défaut sont proposées, pour le plomb et l'arsenic, en fonction de la forme chimique et minérale des substances (cf Tableau 23).

**Tableau 23 : Valeur de biodisponibilité en fonction de la spéciation/forme pour l'arsenic et le plomb, selon la classification semi-quantitative de l'US EPA.**

Substances	Spéciations/formes	Biodisponibilité relative
Arsenic	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Sulfosels	< 30%
	Phosphates d'arsenic	Entre 30 et 70%
	Oxydes de fer, de Mn et de Pb	
	Sulfates de Fer et Zn	
	FeAsO	> 70%
Plomb	Oxydes de PbFe (M)	< 25%
	PbSO <sub>4</sub>	
	PbS	
	Oxydes de Pb (M)	
	Sulfates de PbFe (M)	
	Scories	Entre 25% et 75%
	Phosphates de Pb	
	PbO	
	PbCO <sub>3</sub>	> 75%
	Oxydes de Pb Mn(M)	

Toutefois il faut souligner que l'US EPA ne recommande pas l'utilisation de ces valeurs par défaut dans les évaluations de risque sanitaire. En effet, ces groupes de biodisponibilité ne sont pas précis car ils ont été obtenus à partir d'un faible nombre d'études. Par ailleurs, des incertitudes demeurent concernant les résultats de biodisponibilité et les masses mesurées dans chaque phase d'extraction séquentielle. L'US EPA indique donc que ces groupes sont issus d'une approche semi-quantitative uniquement.

#### **IV.4.2.3 Utilisation des résultats des tests *in vitro* de bioaccessibilité**

Il est important de souligner que les résultats d'un test de mesure de la bioaccessibilité obtenus en phase gastrique et en phase gastro-intestinale sont différents, et par conséquent, pour un composé donné, le choix de la phase à retenir pour la valeur de bioaccessibilité à intégrer dans l'évaluation des risques n'est pas toujours la même selon les auteurs : selon Oomen *et al.* (13), il dépend de l'objectif qu'on assigne à cette valeur (valeur de bioaccessibilité la plus élevée entre les deux phases dans une démarche sécuritaire, ou celle jugée la plus réaliste). Cependant, la plupart recommande d'utiliser la valeur de bioaccessibilité la plus sécuritaire (le plus souvent, pour les métaux, il s'agit des résultats sur la phase gastrique).

##### ***i) Utilisation du résultat de la mesure dans une équation théorique***

Certains auteurs se fondent sur une donnée de bioaccessibilité absolue directement issue du test physiologique mené en laboratoire, et calculent eux-mêmes le FAR (facteur de biodisponibilité relative) de façon théorique. C'est le cas, entre autre, du RIVM (13) et de l'INERIS (96) pour l'estimation de la biodisponibilité relative de certains métaux.

Le RIVM a établi une relation simplifiée entre la valeur de bioaccessibilité dans les sols ( $F_{B, \text{sol}}$ ) mesurée par le test du RIVM, et le FAR, pour l'exposition au plomb par ingestion de sol (13). La métabolisation du plomb est considérée comme non significative (fraction non métabolisée = 100%) pour la matrice sol et la matrice alimentaire (matrice de référence). De plus, la biodisponibilité du plomb dans la matrice de référence est connue et donnée égale à 40% (donnée bibliographique).

$$FAR = \frac{BD_{\text{sol}}}{BD_{\text{VTR}}} = \frac{BA_{\text{sol}} \times AB_{\text{sol}}}{0,4}$$

Avec  $BD_{\text{sol}}$  : biodisponibilité dans le sol  
 $BD_{\text{VTR}}$  : biodisponibilité dans l'étude de référence  
 $BA_{\text{sol}}$  : fraction bioaccessible à partir du sol  
 $AB_{\text{sol}}$  : fraction absorbée à partir du sol

Le facteur d'absorption moyen d'un enfant (tenant compte des périodes à jeun et des périodes avec bol alimentaire) à partir d'une matrice sol est alors introduit dans l'équation et a été estimé à 80%<sup>31</sup> :

$$\text{Ainsi : } FAR = \frac{BA_{\text{sol}} \times 0,8}{0,4}$$

$$\text{D'où : } FAR = \frac{BA_{\text{sol}}}{0,5}$$

Ainsi, le RIVM calcule la biodisponibilité relative du plomb à partir :

- de la bioaccessibilité absolue directement issue du test physiologique mené en laboratoire
- de la biodisponibilité du plomb dans la matrice de référence (donnée bibliographique) ;
- de l'estimation de la fraction absorbée au niveau intestinal (donnée mixte mesure/bibliographique), à partir d'un bol alimentaire (et non d'une matrice sol).

Sur le même principe, l'INERIS a simplifié d'avantage cette relation théorique pour le cadmium et l'arsenic (96). En effet, comme pour le RIVM, il est considéré que la métabolisation des métaux est considérée négligeable (fraction non métabolisée = 100%). De plus, Caboche *et al.* ont montré une égalité du taux d'absorption quelle que soit la matrice (eau ou sol) pour l'arsenic et le cadmium. De ce fait, pour ces substances, l'INERIS propose de calculer le FAR selon l'équation simplifiée suivante :

$$FAR = BA_{\text{sol}}/BA_{\text{VTR}}$$

Avec  $BA_{\text{sol}}$  : fraction bioaccessible à partir du sol  
 $BA_{\text{VTR}}$  : fraction bioaccessible à partir de la matrice de référence

Dans ce cas, considérant l'absence de métabolisation des métaux et une absorption indépendante de la matrice, la biodisponibilité relative est égale à la **bioaccessibilité relative**.

Enfin, dans l'étude de référence pour la construction de la VTR, la matrice est l'eau, et une étude précédente (18) a montré que la bioaccessibilité de ces métaux dans l'eau est de 100%. Ainsi pour l'arsenic et le cadmium, la relation se simplifie :  $FAR = BA_{\text{sol}}$ .

Dans ces conditions de simplification, et uniquement dans ces conditions (absence de métabolisation, absorption indépendante de la matrice, et bioaccessibilité dans la matrice de référence = 100%), la bioaccessibilité absolue peut donc être intégrée directement dans le calcul de risque. Dans ce cas, en termes de risque, on peut écrire :

$$QD_{\text{ajusté}} = \frac{DJE}{VTR} \times BA_{\text{sol}}$$

<sup>31</sup> Il s'agit d'un taux d'absorption moyen calculé à partir d'un taux d'absorption estimé à 100% dans le cas d'un enfant à jeun, et d'un taux d'absorption estimé à 61,5 % en condition « nourri ». Ce taux d'absorption en condition « nourri » est lui-même issu du ratio entre la biodisponibilité du plomb dans l'étude de référence (40%) et la bioaccessibilité du plomb dans une matrice alimentaire déterminée grâce au test physiologique *in vitro* du RIVM (bioaccessibilité estimée entre 45 et 80 %, soit en moyenne 65%), en considérant une absence de métabolisation du plomb.

Selon Denys *et al* (INERIS) (96), les différentes simplifications données ici sont spécifiques aux composés inorganiques cités (arsenic, cadmium) et ne peuvent donc pas être appliquées à toutes les substances sans s'assurer de la pertinence des conditions de simplification.

A noter que dans le cas où les composés étudiés ne sont pas totalement dissous dans la matrice de référence (bioaccessibilité absolue dans la matrice de référence  $\neq$  100%), certaines études (80)<sup>32</sup> suggèrent d'effectuer les deux tests *in vitro* de bioaccessibilité en parallèle avec la même méthode sur les sols et la matrice de référence.

Dans le cadre de l'obtention du FAR, d'autres auteurs se fondent également sur une donnée de bioaccessibilité absolue mais précisent que le test utilisé doit alors être validé par des tests *in vivo* (4)(12). Mais l'utilisation du résultat de bioaccessibilité issu directement d'un test *in vitro* (bioaccessibilité absolue) nécessite de s'assurer que cette valeur n'est pas sous-estimée au regard de la biodisponibilité relative mesurée *in vivo*. En effet, dans ce cas, l'estimation du FAR peut-être, par extension, sous-estimée.

### ***ii) Utilisation du résultat de la mesure dans une équation empirique : l'équation de corrélation *in vivo/in vitro****

Afin d'estimer le FAR, certains auteurs suggèrent d'utiliser les droites de corrélation *in vivo/in vitro* associées au test physiologique utilisé afin de déterminer un facteur de biodisponibilité relative.

Néanmoins, considérant que, dans les études de risque sanitaire, le facteur correctif recherché (FAR) est celui qui met en relation la biodisponibilité du sol étudié avec celle de la matrice de référence utilisée dans les études toxicologiques ayant servi à l'élaboration de la VTR, ces auteurs soulignent également la différence de matériel expérimental entre les études *in vivo* de biodisponibilité et les études de toxicité (notamment la matrice de référence et les animaux utilisés). Cette différence de matériel expérimental ne permet donc pas une utilisation systématique, sur des bases rigoureuse et pertinente, des corrélations linéaires *in vivo/in vitro* pour l'établissement du FAR utilisé dans les études de risque sanitaire (12)(147).

Pour qu'il y ait équivalence entre FAR et RBD (biodisponibilité relative de l'étude *in vivo*) :

- il est nécessaire que les corrélations entre la bioaccessibilité (relative ou absolue) et la biodisponibilité relative aient pris en compte une matrice identique à celle utilisée dans l'étude toxicologique retenue pour la construction de la valeur toxicologique de référence<sup>33</sup> ;
- outre l'impact de la matrice de référence, l'utilisation d'animaux différents pour les expérimentations relatives aux études toxicologiques d'une part, et aux études de biodisponibilité d'autre part, complique l'interprétation des résultats et l'utilisation des équations de corrélation linéaires citées précédemment. Les différences inter-espèces concernant le tractus gastro-intestinal, le métabolisme, la distribution et l'excrétion, comme la sensibilité intra-espèce, peuvent être significatives. Ainsi, pour résoudre ces biais expérimentaux, il faudrait donc utiliser les mêmes animaux, ou *a minima*, les mêmes typologies d'animaux entre les deux types d'études expérimentales, et par extension, utiliser des tests de biodisponibilité simulant les conditions humaines lorsque les données toxicologiques sont issues d'études épidémiologiques. Concernant les études de biodisponibilité, elles utilisent le plus souvent des tests simulant le système humain (porcs, primates...).

Le tableau suivant indique les matrices et animaux utilisés dans les études de biodisponibilité et ceux utilisés dans les études toxicologiques.

<sup>32</sup> Exposé de Mike Dutton de la société Inco Limited

<sup>33</sup> Santé Canada travaille sur le recueil des données de biodisponibilité de diverses substances dans la matrice de référence de l'étude toxicologique (31). A ce titre, Santé Canada nous a transmis un rapport intitulé « Summary of bioavailability values from key toxicity studies reported by Health Canada – Final draft – March 2005 ».

**Tableau 24 : Matrices et animaux utilisés dans les études de biodisponibilité (avec  $r^2 > 0,6$ ) et ceux utilisés dans les études toxicologiques.**

Substance	Test	Source	Matrice de référence Etude BD <i>in vivo</i>	Animal utilisé Etude BD <i>in vivo</i>	Forme chimique Etude BD <i>in vivo</i>	Matrice VTR	Animal utilisé VTR	Forme chimique VTR
As	UBM	Caboche 2009 (18)	Solution d'arseniate de sodium	Porc juvénile	As V	Eau (US EPA)	étude épidémiologique	Pas d'indication
	SBRC gastrique	Juhasz 2009 (82)	Solution	Porc	As III et As V			
	PBET gastrique	Juhasz 2009 (82)	Solution	Porc	As III et As V			
	SBET gastrique	Juhasz 2007 (83)	Solution	Porc	As III et As V			
	IVG	Rodriguez <i>et al.</i> , 1999 (57)	Solution d'arseniate de sodium	Porc juvénile	As V			
	IVG - AB		Solution d'arseniate de sodium	Porc juvénile	As V			
	DIN	Grøn et Anderson, 2003 (12)	Pas d'indication	Porc	Pas d'indication			
	IVG avec aliment	Basta <i>et al.</i> , 2007(62)	Solution d'arseniate de sodium	Porc juvénile	As V			
	IVG sans aliment		Solution d'arseniate de sodium	Porc juvénile	As V			
	RIVM	Oomen <i>et al.</i> , 2006 (13)	Solution d'arseniate de sodium	Porc juvénile	As V			
Plomb	UBM	Caboche 2009 (18)	Solution d'acétate de plomb	Porc juvénile	Pb2+	Aliment (enfants nourri au sein ou lait maternisé) (RIVM)	Etude épidémiologique	Pas d'indication
	SBRC (gastrique)	Drexler 2007 (59)	Solution d'acétate de plomb	Porc juvénile	Pb2+			
	SBRC (gastrique)	Medlin, 1995 (cité dans (18) )	Solution d'acétate de plomb	Porc	Pb 2+			
	RIVM	Grøn <i>et al.</i> , 2005 (19)	Pas d'indication	Porc	Pas d'indication			
	SBRC		Pas d'indication	Porc juvénile	Pas d'indication			
	RIVM	Oomen 2006 (13)	Solution d'acétate de plomb	Porc juvénile	Pb2+			
	PBET	Ruby <i>et al.</i> , 1996 (64)	Aliment	Rat	Pas d'indication			
	IVG sans aliment	Schroder <i>et al.</i> , 2004 (86)	Solution d'acétate de plomb	Porc	Pb2+			

Substance	Test	Source	Matrice de référence Etude BD <i>in vivo</i>	Animal utilisé Etude BD <i>in vivo</i>	Forme chimique Etude BD <i>in vivo</i>	Matrice VTR	Animal utilisé VTR	Forme chimique VTR
	IVG avec aliment		Solution d'acétate de plomb	Porc	Pb2+			
Cadmium	UBM	Caboche 2009 (18) (24)	Solution de chlorure de cadmium	Porc juvénile	Chlorure de cadmium	Eau (Il existe une VTR pour les aliments) (US EPA)	Etude épidémiologique	Pas d'indication
	RIVM gastro intestinal	Grøn 2005(19) (124)	« référence soluble »	Porc juvénile	Pas d'indication			
	PBET	Juhasz <i>et al.</i> , 2010 (44)	Solution d'acétate de cadmium	Souris	Pas d'indication			
	IVG sans aliment	Schroder <i>et al.</i> , 2003 (53)	Solution de chlorure de cadmium ?	Porc juvénile	Pas d'indication			
	IVG avec aliment		Solution de chlorure de cadmium ?	Porc juvénile	Pas d'indication			
Antimoine	UBM	Caboche 2009 (18)	Solution d'antimoniate de potassium	Porc juvénile	Sb V	Tartrate de potassium antimoine en solution aqueuse (US EPA)	Rat	Sb III
HAP	UBM	Grøn 2007 (81)	BaP dans l'hexane mixé avec des aliments	porc nain (minipig)	Ne s'applique pas	Huile de soja (RIVM/ INERIS) Alimentation (US EPA)	Rat	BAP
	PBET	Pu <i>et al.</i> 2004 (87)	Phénanthrène dissout dans l'emulphor/éthanol/eau	Rat	Ne s'applique pas			
	DIN	Grøn et Anderson, 2003 (12)	Pas d'indication	« Minipig »	Ne s'applique pas			

BD : biodisponibilité



Pour l'arsenic, le plomb et le cadmium, toutes les études de biodisponibilité ont été réalisées sur le porc (à l'exception du cadmium avec le test PBET, réalisé sur la souris). Or il est considéré que cette espèce animale représente correctement la physiologie humaine au niveau du tractus digestif. D'autre part, les valeurs toxicologiques de référence sont issues d'études épidémiologiques. Par conséquent, on peut considérer, pour ces 3 composés, l'absence de biais inter-espèce significatif entre les études de biodisponibilité et les études toxicologiques. En revanche les modèles animaux utilisés pour l'antimoine et les HAP (dans l'étude de Grøn *et al.* avec le test UBM) sont différents entre les études de biodisponibilité *in vivo* et les études de toxicité.

Concernant la matrice utilisée dans les études de biodisponibilité, il s'agit, pour les composés inorganiques, de solutions de sel soluble du contaminant étudié (arséniate de sodium, acétate de plomb, chlorure de cadmium et antimoniate de potassium (Sb V)).

Dans les études toxicologiques, la matrice utilisée pour l'arsenic et le cadmium est l'eau de boisson, et une solution aqueuse pour l'antimoine (tartrate d'antimoine et de potassium - Sb III -). La spéciation chimique de l'arsenic dans l'étude épidémiologique n'est pas connue. L'antimoine est de valence (III) dans l'étude toxicologique. Pour l'arsenic, le cadmium et l'antimoine, les matrices sont donc relativement similaires entre les études de biodisponibilité et les études de toxicité (solutions), mais certaines spéciations chimiques sont inconnues (arsenic) ou distinctes (antimoine).

Pour le plomb, la matrice utilisée dans l'étude toxicologique est une matrice alimentaire : le lait (maternisé ou maternel). Oomen *et al.* font remarquer que la présence d'aliment lors d'une étude de biodisponibilité du plomb modifie les résultats du fait de la compétition avec certains éléments comme le calcium ou encore le fer (13). L'étude toxicologique tient donc compte de la compétition du calcium et du plomb dans l'absorption ce qui n'est pas le cas dans l'étude de biodisponibilité où la matrice est une solution aqueuse d'acétate de plomb.

En ce qui concerne les HAP, la matrice utilisée dans l'étude de toxicité du RIVM semble une matrice de type alimentaire (aliments mixés ou huile végétale), différente de celle utilisée dans l'étude de biodisponibilité *in vivo*.

Ainsi :

- Pour l'arsenic et le cadmium : l'utilisation de l'équation de corrélation est potentiellement envisageable avec tous les tests cités précédemment, à l'exception du test PBET pour le cadmium (différence de modèle animal). Néanmoins, une analyse plus approfondie sur la représentativité de ces tests doit être menée, car le seul critère  $r^2$  ne peut déterminer à lui seul la validité de l'équation de corrélation ;
- Pour le plomb, l'antimoine et les HAP, l'utilisation de l'équation de corrélation n'apparaît pas envisageable.

## V. BILAN ET PROPOSITIONS

### V-1. Bilan

#### V.1.1. Faisabilité technique

##### V.1.1.1 Investigations

Globalement il ne semble pas que la prise en compte de la bioaccessibilité dans les études de risque modifie fondamentalement la manière dont sont conduites les investigations sur site. Cependant cela pourrait amener les bureaux d'études à renseigner la spéciation (via par exemple, un test chimique d'extractions séquentielles) ou forme chimique sous laquelle se présente le contaminant et éventuellement préciser quelques caractéristiques du sol non recherchées actuellement (teneur en oxyde et oxy-hydroxydes de fer et d'aluminium).

Concernant la spéciation/forme, ce paramètre peut être important dans les premières étapes de la démarche d'intégration de la biodisponibilité relative dans les évaluations de risques sanitaires. En effet, en se basant sur des données bibliographiques et dans une approche semi quantitative, la spéciation/forme peut nous renseigner sur l'intervalle de valeurs dans lequel se trouve la biodisponibilité attendue (cf Tableau 23). Ainsi, au regard de ces données, il pourra être jugé pertinent ou non d'engager des tests de bioaccessibilité (cf logigramme présenté dans le chapitre IV.3.2).

##### V.1.1.2 Analyse

Au vu de l'état des connaissances établi dans le chapitre IV, et plus particulièrement celui relatif à l'analyse (chapitre IV-2), la pertinence des essais *in vitro* de mesure de la bioaccessibilité peut être évaluée selon divers critères :

- la représentativité physiologique des protocoles mis en œuvre, et leur faisabilité technique ;
- la corrélation *in vivo* / *in vitro* des résultats (ou représentativité physiologique du résultat) ;
- la répétabilité et la reproductibilité intra- et inter- laboratoires de l'essai.

#### i) Faisabilité technique et représentativité physiologique du protocole.

Le Tableau 25 présente les essais pouvant être distingués pour leur pertinence en fonction de la représentativité physiologique de leur protocole et leur facilité de mise en œuvre (faisabilité), selon les critères suivants :

##### ○ Critères de représentativité physiologique du protocole

- les compartiments mimés : plus le nombre de segments est important, plus il est possible de considérer que l'on se rapproche des conditions physiologiques,
- les temps de résidence dans les compartiments estomac et intestin, principalement impliqués dans l'absorption. Les références physiologiques considérées sont 1 heure dans l'estomac et 3,5 heures dans l'intestin grêle (19),
- l'introduction de nourriture au cours des essais, ceci devant permettre également de se rapprocher de conditions physiologiques. Pour rappel, l'introduction de nourriture semble avoir un impact variable selon les essais, mais aussi selon les aliments utilisés, les sols étudiés et la nature des polluants. Le développement de version avec nourriture et en particulier adaptation du protocole afin de mimer les modifications physiologiques lors de l'alimentation (augmentation du pH, des concentrations en enzymes et biles) paraît être un critère pertinent d'un point de vue physiologique, en particulier pour les molécules organiques,
- la composition des solutions digestives, celle-ci étant plus ou moins élaborée et proche des conditions physiologiques selon les essais,
- le ratio liquide/solide entre le sol et les solutions digestives, celui-ci étant également plus ou moins proche des conditions représentatives de la réalité de l'ingestion de sol (voie d'exposition étudiée ici).

○ Critères de faisabilité du protocole

- la durée de l'essai. Plus celle-ci est courte, plus le test est ici considéré comme pertinent. Une durée limitée engendre des coûts plus faibles (notamment en terme de personnel) et des délais d'analyse et de rendu de résultats plus courts et mieux adaptés aux besoins des bureaux d'étude ;
- la verrerie nécessaire. Selon les tests la verrerie employée est de plus ou moins grand volume et est plus ou moins spécifique (ex : flacon verre classique, ampoule à décanter, tubes à centrifuger...), ceci engendrant des coûts variables (non évalués) et des manipulations plus ou moins faciles,
- le mode d'agitation. L'agitation *end over end* est reconnue comme la plus efficace, la plus reproductible et ne risquant pas d'induire des contaminations liées, par exemple, à l'emploi de pâle ou d'agitateur magnétique. Toutefois selon les essais et la verrerie employée, elle nécessite d'utiliser des agitateurs plus ou moins volumineux,
- le type de matériel de laboratoire. Certains tests nécessitent des bains thermostatés et/ou des centrifugeuses de volumes plus ou moins importants. D'autres tests nécessitent également du matériel beaucoup plus spécifique et ne pouvant *a priori* être installé/utilisé en routine par tout laboratoire (ex : TIM).

Il faut souligner que certains critères peuvent être considérés pertinents dans le cadre de la représentativité physiologique du protocole, mais au contraire non pertinents au regard de la facilité de mise en œuvre (ex : compositions des solutions digestives).

A noter que d'autres critères n'ont pas été retenus ici car ne permettant pas réellement de discriminer les essais au regard de la représentativité physiologique de leur protocole (sans tenir compte des résultats proprement dits). Par exemple, le critère pH n'a pas été considéré car tous les tests emploient des pH couvrant la gamme de ceux rencontrés physiologiquement, et ceci malgré le fait que le pH soit un facteur majeur influençant les résultats de bioaccessibilité.

Pour chacun des critères retenus, deux niveaux de pertinence ont été distingués (niveaux élevé et modéré). Un 3<sup>ème</sup> niveau implicite de pertinence faible n'est pas représenté ici, les tests inclus dans ce niveau n'étant pas pertinents pour le critère étudié.

**Tableau 25 : Tests de bioaccessibilité pouvant être distingués pour leur pertinence élevée ou modérée concernant des critères de représentativité physiologique et de faisabilité technique.**

Pertinence	Types de critères	Elevée	Modérée
Segments mimés	Représentativité physiologique du protocole (sans tenir compte ici des résultats proprement dits)	TIM / SHIME (valves et membrane dans le 1 <sup>er</sup> / colon et flore intestinale dans le second)	DIN / <b>RIVM</b> / <b>UBM</b> / BM-RS (3 segments : salive, estomac, intestin grêle)
Temps de résidence estomac		PBET / SBET / IVG / <b>UBM</b> / (1 H)	
Temps de résidence intestin		<b>UBM</b> / BM-RS (4H)	PBET / SHIME (3H)
Nourriture		<b>RIVM</b> (mimant les changements physiologiques lors de l'alimentation)	DIN / IVG (ne mimant pas les changements physiologiques lors de l'alimentation)
Solutions digestives		<b>RIVM</b> / <b>UBM</b>	
Ratio liquide : solide	Faisabilité technique	<b>RIVM</b> / BM-RS	
Durée		SBET/ Pharmacopée / IVG (courte < 3H)	PBET / <b>RIVM</b> / <b>UBM</b> / BM-RS (intermédiaire < 7H)
Verrerie		<b>RIVM</b> / <b>UBM</b> (volumes plus faibles / tubes directement centrifugés)	
Agitation <i>end over end</i>		<b>RIVM</b> / <b>UBM</b> (agitateur plus petit)	SBET (agitateur plus gros)
Matériel employé (simplicité du test)		PBET / SBET (filtration uniquement mais bain thermostaté important) <b>RIVM</b> / <b>UBM</b> (centrifugation mais tests réalisés directement dans tubes à centrifuger et incubateurs /bains moins importants que d'autres)	DIN, SHIME, IVG (bains assez importants, centrifugation ou ultracentrifugation)

**En gras, les essais distingués les plus fréquemment.**

Selon les critères et degrés de pertinence définis, les tests UBM et RIVM sont les plus souvent distingués. En effet, les caractéristiques remarquables de ces essais sont les suivantes :

- ils miment 3 segments (salive, estomac, intestin grêle),
- ils sont de durées intermédiaires (4-5 H environ)
- ils utilisent des solutions digestives complexes mais représentatives de la physiologie,
- les temps de résidence, en particulier dans le test UBM, sont les plus proches des références physiologiques moyennes considérées,
- ils sont réalisés dans des tubes pouvant directement être centrifugés, ayant les volumes les plus faibles, et nécessitant *a priori* des appareils (centrifugeuse et agitateur par rotation) de taille plus limitée que d'autres essais,
- ils nécessitent du matériel relativement classique de laboratoire d'essais,
- l'évaluation de la bioaccessibilité gastrique et intestinale se fait de manière distincte (un échantillon subissant la phase salivo-gastrique et un autre la phase salivo-gastrique et intestinale),
- une version du test avec nourriture et adaptation des pH, concentrations en enzymes et en bile, a été développée par le RIVM, pour évaluer la bioaccessibilité de molécules organiques telles que les HAP. Le test FOREhST, principalement tiré de la version RIVM avec nourriture, pourrait également être retenu pour étudier la bioaccessibilité des molécules organiques.

La pertinence des essais pourrait également être étudiée distinctement en fonction de la nature des polluants (inorganiques ou organiques). Cependant dans la mesure où, pour un certain nombre de critères, les tests « à distinguer » seraient identiques, cette différenciation n'apparaît pas utile. En revanche, pour les molécules organiques, certains aspects nous semblent indispensables :

- la réalisation d'une phase intestinale, la solubilisation et l'absorption des molécules organiques étant *a priori* plus élevées dans ce segment que dans l'estomac,
- la réalisation de l'essai en présence de nourriture, celle-ci participant, en fonction de sa composition plus ou moins riche en graisses, à la solubilisation des molécules organiques,
- la réalisation d'essai avec des solutions intestinales assez élaborées en termes de composants avec l'emploi notamment d'extrait de bile, de protéines telles que des mucines, .... participant également à une meilleure solubilisation des composés organiques hydrophobes.

Des critiques peuvent également être formulées à l'égard des essais RIVM/UBM :

- même si le matériel est relativement classique, ces essais utilisent des appareillages nécessitant un investissement non négligeable (centrifugeuse, incubateur, agitateur par rotation),
- ils sont conduits uniquement en aérobie. Se placer en aérobie puis en anaérobie aurait été plus proche de la réalité physiologique,
- comme la plupart des autres essais, aucune flore bactérienne n'est introduite,
- l'UBM n'a, à ce jour, pas encore de version avec introduction de nourriture et a principalement été employé pour étudier la bioaccessibilité des métaux. Toutefois, il semble adaptable, à l'instar des tests RIVM/FOREhST, aux molécules organiques.

Aussi objectifs soient-ils, ces critères et degrés de pertinence n'ont pas permis de démontrer la représentativité physiologique des résultats obtenus. Par exemple, pour rappel, pour les molécules inorganiques (As et Pb) les résultats de l'étude BARC 2011 (56) sur un seul sol de référence ont mis en évidence que les protocoles *in vitro* les plus représentatifs de la réalité (ex ; UBM, SHIME) ne fournissaient pas les valeurs les plus proches des biodisponibilités mesurées *in vivo* mais, qu'au contraire, les procédures physiologiques simples (ne mimant que la phase gastrique) telles que le RBALP, ou TCLP, donnaient des valeurs plus réalistes : à titre d'exemple, pour le plomb en phase gastrique, les essais UBM et SHIME fournissent des valeurs de bioaccessibilité relative différentes de -22% et - 40 % par rapport à la biodisponibilité relative, tandis que les procédures HC, TCLP et RBALP fournissent, respectivement, des valeurs de -13% à +3,5% et de -8,9% à +5,6 %.

## ii) Représentativité physiologique du résultat.

Plusieurs auteurs ont conduit des études de corrélations entre les résultats de biodisponibilité *in vivo* et ceux de bioaccessibilité *in vitro*. Le Tableau 26 résume, par test, les équations de corrélation pour lesquelles les critères de validité sont remplis, à savoir :

- corrélation linéaire statistiquement significative avec  $r^2 > 0,6$ ,
  - gamme suffisamment large de valeurs de biodisponibilité (valeur minimale d'environ 70 %s), ceci devant permettre de valider la corrélation pour divers types de sols, autorisant ainsi, en théorie, l'utilisation du test quel que soit le site étudié ;
  - une bonne répartition des valeurs de biodisponibilité dans la gamme ;
  - une étude de comparaison R/R afin d'éviter tout biais d'interprétation, notamment pour l'étude de la phase gastro-intestinale (certaines molécules, comme le plomb, l'arsenic, le cadmium et l'antimoine, ayant, dans le compartiment gastrique, des bioaccessibilités proches de 100 % dans les matrices de référence, l'utilisation de la bioaccessibilité absolue n'engendre dans ce cas pas de biais significatif) ;
- A noter que dans la plupart des travaux, les matrices de référence utilisées pour les tests *in vivo* ne sont pas précisées.

Tableau 26 : Equations de corrélations *in vivo/in vitro* ayant un coefficient de détermination r<sup>2</sup> > 0,6 (d’après le Tableau 9 recensant l’ensemble des équations disponibles)

Test de bioaccessibilité	Substance	Auteur (publications)	BAc (A ou R) / BD (A ou R)	Equation dans la phase gastrique (PG)	Equation dans la phase intestinale (PI)	r <sup>2</sup> PG	r <sup>2</sup> PI	Nombre/type de sols étudiés	Gamme de biodisponibilité - répartition ?
HCl hydroxylamine (1 heure)	Arsenic	Lowney	A/R	RBD (%) = 0,2262x BAc (%) + 1,8263	sans objet	0,6871 np	sans objet	14	np
SBRC	Arsenic	Juhasz <i>et al.</i> , 2009 (82)	A/R	RBD (%) = 0,992 x BAc (%) + 1,656	RBD (%) = 1,644 x BAc (%) + 5,626	0,754 np	0,654 np	12 sols variés	6,9-74,7 %
SBRC	Plomb	Medlin, 1995 reporté par Caboche, 2009 (18)	A/R	RBD (%) = 1,149 x BAc (%) - 7,816	sans objet	0,85 np	sans objet	15 sols	2-83%
SBRC	Plomb	Gron <i>et al.</i> , 2005 (19)	R/R	RBD (%) = 1,449 X BAc (%) – 0,406	sans objet	0,630	sans objet	18	8-115% environ [2]
SBRC/RBALP (0,4 M Glycine, pH= 1,5)	Plomb	Drexler et Brattin, 2007 (59) US-EPA, 2009 (85)	A/R	RBD (%) = 0,878 x BAc (%) - 0,028	sans objet	0,924 p<0,001	sans objet	19 matrices	1-105 %
SBET	Arsenic	Juhasz <i>et al.</i> , 2007 (83)	A/R	RBD (mg/kg) = 0,93 x BAc (mg/kg) + 14,19	sans objet	0,92 p < 0,01	Sans objet	49 sols d’origine variée	6,9-74,7 %
PBET	Arsenic	Juhasz <i>et al.</i> , 2009 (41)	A/R	RBD (%) = 1,162 x BAc (%) + 10,096	RBD (%) = 1,762 x BAc (%) + 5,682	0,638 np	0,665 np	np	np
PBET	Cadmium	Juhasz <i>et al.</i> , 2010(44)	A/R	np	RBD (%) = 1,091 X BAc (%) – 5,140	0,74 np	0,835 np	7 sols variés	10,1-92,1%
IVG avec aliment (in vivo = sang)	Arsenic	Basta <i>et al.</i> , 2007 (62)	A/R	RBD (%) = 1,075 x BAc (%) + 6,25	RBD (%) = 1,22 x BAc (%) + 6,02	0,922 p < 0,01	0,922 p < 0,01	10 sols miniers	2,7-42,8 %
IVG sans aliment (in vivo = sang)	Arsenic	Basta <i>et al.</i> , 2007 (62)	A/R	RBD (%) = 1,299 x BAc (%) +6,649	RBD (%) = 1,887 x BAc (%) + 7,47	0,846 p < 0,01	0,81 p < 0,01		
IVG	Arsenic	Rodriguez <i>et al.</i> , 1999 (57)	A/R	RBD (%) = 1,136* x BAc (%) + 2,295*	RBD (%) = 1,316 x BAc (%) + 1,789	0,689 p < 0,01	0,672 p < 0,01	13 matrices typiques de sites miniers et de fonderie (déchets stockés)	2,7-42,8 %
IVG - AB	Arsenic	Rodriguez <i>et al.</i> , 1999 (57)	A/R	RBD (%) = 1,149 x BAc (%) + 1,356	RBD (%) = 1,351 x BAc (%) - 0,203	0,64 p < 0,05	0,624 p < 0,05		
IVG avec aliment (in vivo = sang)	Plomb	Schroder <i>et al.</i> , 2004 (86)	A/R	RBD (%) = 2,564 x BAc (%) - 7,615	RBD (%) = 100 x BAc (%) - 0,02	0,865 p < 0,001	0,64 p < 0,001	11 à 18 sols	1-87 % (sang)
IVG sans aliment (in vivo = sang)	Plomb	Schroder <i>et al.</i> , 2004 (86)	A/R	RBD (%) = 1,538 x BAc (%) + 2,215	RBD (%) = 100 x BAc (%) - 52	0,792 p < 0,001	0,144 (non significatif)		
IVG avec aliment (in vivo = sang)	Cadmium	Schroder <i>et al.</i> , 2003 (53)	A/R	RBD (%) = 5,263 x BAc (%) - 144,7	RBD (%) = 7,692 x BAc (%) – 39	0,302 non significatif	0,64 p < 0,01	10 sols	10,4-116 %
IVG sans aliment (in vivo = sang)	Cadmium	Schroder <i>et al.</i> , 2003 (53)	A/R	RBD (%) = 1,667 x BAc (%) - 42,2	RBD (%) = 4,762 x BAc (%) – 122,9	0,740 p < 0,01	0,292 non significatif		
RIVM (0,06 g)	Arsenic	Oomen, <i>et al.</i> , 2006 (13)	R/R	RBD (%) = 0,802 x BAc (%)	RBD (%) = 0,9568 x BAc (%)	0,9083 np	0,7962 np	8 sols	2-3 à < 45% (2)
RIVM (0,6 g)	Arsenic	Oomen, <i>et al.</i> , 2006 (13)	R/R	RBD (%) = 1,8850 x BAc (%)	RBD (%) = 5,1787x BAc (%)	0,9366 np	0,2666 np		
RIVM (0,06 g)	Plomb	Oomen, <i>et al.</i> , 2006 (13)	R/R	RBD (%) = 0,926 x BAc (%)	RBD (%) = 0,859 x BAc (%)	0,6784 np	0,6588 np	10 sols variés	1-105 %
RIVM (0,6 g)	Plomb	Oomen, <i>et al.</i> , 2006 (13)	R/R	RBD (%) = 1,268 x BAc (%)	RBD (%) = 1,447x BAc (%)	0,9477 np	0,8119 np	7 sols variés	
RIVM [1]	Plomb	Gron <i>et al.</i> , 2005 (19)	R/R	RBD (%) = 1,471 X BAc (%) – 0,25	sans objet	0,758	sans objet	12 sols	np
RIVM	Cadmium	Gron <i>et al.</i> , 2005(19)	R/R	RBD(%) = 1,136 x BAc (%) – 0,284	RBD (%) = 1,075 x BAc (%) - 0,042	0,575 np	0,635 np	17 (PG) ou 14 (PI) sols	15-115 % environ (2)
RIVM	B(a)pyrène	Gron <i>et al.</i> , 2007 (81)	R/R		RBD (%) = 3,1 x BAc (%) + 9,2		0,814	7 sols	7,3-55 %
UBM	Arsenic	Caboche, 2009 (18)	R/R	RBD (%) = BAc (%) + 0,01	RBD (%) = 0,990 x BAc (%) – 0,039	0,98 p < 0,01	0,97 p < 0,01	13 sols variés	3-72 %
UBM (L : S = 100)	Arsenic	Wragg 2011 (69)	R/R	RBD (%) = 2,5 x BAc rel	RBD (%) = 6,25 x BAc rel	0,77 np	0,63 np	np	np
UBM (L : S = 1000)	Arsenic	Wragg 2011 (69)	R/R	RBD (%) = 1,12 x BAc rel	RBD (%) = 1,14 x BAc rel	0,91 np	0,83 np	np	4,07 à 51%
UBM	Plomb	Caboche 2009 (18)	R/R	RBD = 0,909 x BAc (%) – 1,691	RBD = 0,917 x BAc (%) – 1	0,93 p < 0,01	0,89 p < 0,01	14 sols variés	10-82%
UBM	Plomb	Wragg 2011 (69)	R/R	RBD (%) = 1,28 x BAc rel + 13	RBD (%) = 2,63 x BAc rel + 13	0,61 Np	0,57 np	np	14-102%
UBM	Cadmium	Caboche 2009 (18)	R/R	RBD (%) = 1,042 x BAc (%) – 2,771	RBD (%) = 1,064 x BAc (%) – 1,521	0,97* p<0,01	0,91 p < 0,01	10 sols variés	13-96%
UBM	Cadmium	Wragg 2011 (69)	R/R	RBD (%) = 1,59 x BAc rel – 39	RBD (%) = 1,75 x BAc rel – 53	0,69 Np	0,51 np	np	10,4 à 89%
DIN (1 type de sol = Lothringen 2)	12 HAP	Gron <i>et Anderson</i> , 2003 (12)	A/R	np	rétenion (≈ RBD) = 1,1376 x BAc (%) + 14,854	np	0,688	1 sol : 12 points	np
DIN	4 HAP	Gron <i>et Anderson</i> , 2003 (12)	A/R	np	rétenion (≈ RBD) = 1,0261 x BAc (%) + 22,889	np	0,7146	4 sols : 15 points	np

[1] pH gastrique < 1,8, exclusion de 6 sols pour lequel le pH en fin de phase gastrique était > 1,8  
[2] Lecture graphique  
Np : non précisé  
RBD = BD rel = Biodisponibilité relative mesurée *in vivo*  
BAc = Bioaccessibilité (absolue si corrélation A/R, relative si corrélation R/R) mesurée *in vitro*

En considérant les critères de validité mentionnés ci-dessus, les tests suivants présentent au moins une corrélation *in vivo/in vitro* satisfaisante dans l'un ou l'autre, voire les deux compartiments digestifs (cf. Tableau 26) :

- SBET, RBALP ou SBRC pour le plomb et l'arsenic,
- PBET pour l'arsenic et le cadmium,
- IVG pour le plomb et le cadmium.
- RIVM pour le plomb et le cadmium (uniquement dans la phase intestinale pour ce dernier).  
A noter que le test RIVM a également été corrélé avec la biodisponibilité du benzo(a)pyrène dans 7 sols, celle-ci variant de 7,3 à 55 %. La gamme n'est pas large mais les études relatives aux molécules organiques sont rares. Il n'est donc pas exclu qu'à l'avenir ce critère soit amélioré, à la faveur de nouvelles expérimentations.
- UBM pour le plomb, le cadmium et l'arsenic. A noter que pour cet essai et ces éléments, les corrélations démontrées par Caboche (18) ont toutes des  $r^2 > 0,6$  dans les deux compartiments et même des  $r^2 > 0,9$  sauf pour le plomb dans la phase intestinale ( $r^2 = 0,89$ ),
- DIN et certains HAP (selon les types de sols),
- le test simple HCl hydroxylamine sans mise en condition physiologique à 37°C (*a priori*), pour l'arsenic.

Il faut également souligner que seuls les tests physiologiques simples SBET/SBRC/RBALP, et complexes PBET, UBM et RIVM présentent des équations dont la pente est peu significativement différente de 1 (entre 0,8 et 1,2) signifiant, en sus d'un  $r^2 > 0,6$ , d'une part, une bonne représentativité physiologique des résultats *in vitro* au regard de l'*in vivo*, et démontrant d'autre part, que la bioaccessibilité est l'étape limitante du processus de biodisponibilité pour les polluants étudiés.

Certains essais n'ont *a priori* fait l'objet, à ce jour, d'aucune étude de corrélation : essais SHIME, TIM ou encore la procédure FOREhST récemment publiée (52) tirée du test RIVM et destinée à évaluer la bioaccessibilité des molécules organiques.

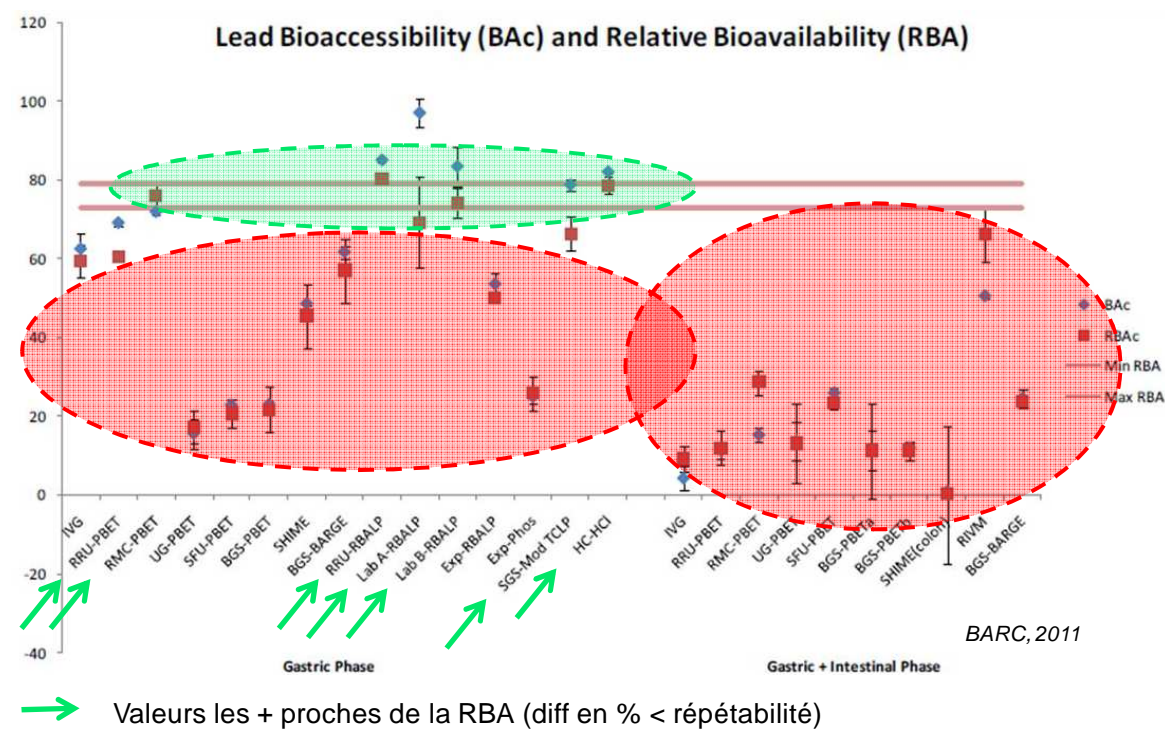
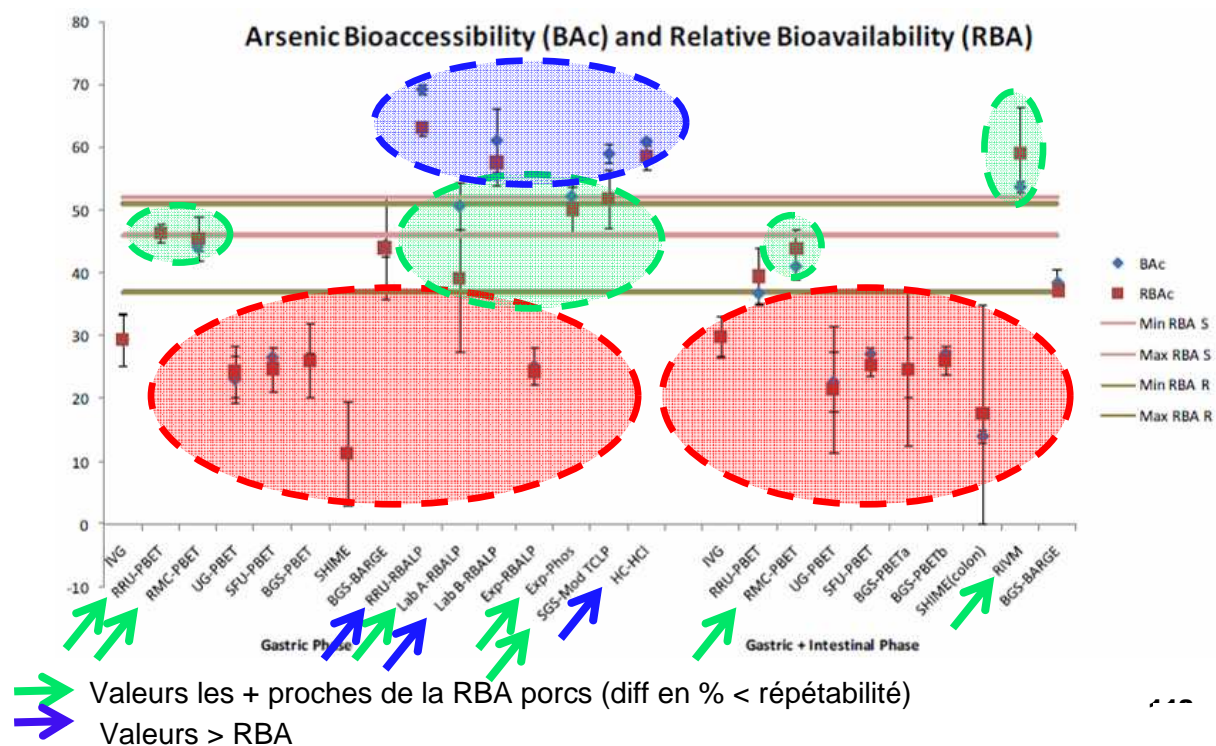
Tous les polluants confondus, considérant l'ensemble des équations recensées,

- dans la phase intestinale, ce sont les essais RIVM et UBM qui montrent des corrélations significatives ( $r^2 > 0,6$ ) dans les plus fortes proportions (71 et 75 % des cas respectivement, contre 50% pour les autres tests),
- dans la phase gastrique, hormis le test DIN pour lequel aucune corrélation avec  $r^2 > 0,6$  n'a été observée (1 équation recensée uniquement), les autres tests sont corrélés avec  $r^2 > 0,6$  dans 71 à 78 % des cas pour les tests tests IVG, PBET, RIVM et UBM, et dans 42% des cas pour le test SBET/RBALP<sup>34</sup>. Les tests RIVM et UBM fournissent des  $r^2 > 0,9$  dans respectivement 43 et 75 % des cas, contre 11 à 25 % pour les autres essais.

Ces résultats conduisent donc aussi à distinguer les essais RIVM /UBM en terme d'essais fournissant des résultats les plus souvent corrélés de façon plus robuste aux résultats de biodisponibilité *in vivo*.

Ceci peut toutefois être nuancé, par le rappel de certains résultats (56) ayant montré que le test UBM n'a pas fourni les résultats les plus proches de la biodisponibilité de l'arsenic et/ou du plomb dans le sol de référence NIST 2710, contrairement à certains tests physiologiques simples (RBALP, ex-Phos, TCLP, HCl). Ce constat est illustré dans la Figure 24.

<sup>34</sup> A noter que le test SBET/RBALP a toutefois fait l'objet du plus grand nombre d'études : 12 équations recensées pour différents polluants : As, Pb, Cd, HAP et à différents pH, 1,5 ou 2,5



BAc : Bioaccessibilité absolue ; RBaC : bioaccessibilité relative ; RBA : Biodisponibilité relative ; S : modèle porc (swine) ; R : modèle rat

**Figure 24 :** Illustration des résultats de bioaccessibilités absolue (losanges bleus) et relative (carrés rouges) et de biodisponibilité relative (lignes horizontales roses et brunes) de l'arsenic (premier graphique) et du plomb (second graphique) dans le sol de référence NIST 2710 (56).



### iii) Critères de répétabilité et reproductibilité.

Comme pour toute analyse de laboratoire, il convient pour les essais de bioaccessibilité de vérifier leur répétabilité et reproductibilité.

L'ensemble des essais semble avoir en général des coefficients de variation relatifs à la répétabilité considérés comme satisfaisants selon certains auteurs (18)(69) car, inférieurs à 10%. Les données disponibles concernant principalement les éléments inorganiques, il conviendrait (dans les essais à venir) de vérifier cette observation pour les molécules organiques.

Toutefois, il peut-être souligné que les études n'ont probablement pas toutes la même robustesse statistique, celle-ci étant dépendante du nombre de réplicats et du nombre et type de sols inclus dans le calcul de ces éléments statistiques.

En terme d'étude de reproductibilité intra- ou inter-laboratoire, peu de travaux sont disponibles à ce jour. Wragg *et al.* (69) ont récemment publié les résultats de travaux inter-laboratoires relatifs au test UBM pour les éléments plomb, arsenic et cadmium. Cette étude confirme une répétabilité satisfaisante mais montre que la reproductibilité doit encore être améliorée car elle dépasse, en général, le seuil fixé par les auteurs (coefficient de variation < 20%). Elle souligne également la nécessité d'assurer un contrôle plus strict de certains paramètres tels que le pH afin d'améliorer la reproductibilité et probablement ainsi les corrélations avec les résultats *in vivo*.

Le test UBM, et éventuellement les essais qui en sont proches (RIVM avec ou sans nourriture et FOREhST), se distingue aussi du fait d'un faible nombre de travaux inter-laboratoires réalisés et/ou publiés. Cet essai étant issu d'un effort d'harmonisation, il est probable qu'il bénéficiera d'un plus grand nombre d'études permettant d'affiner le protocole et d'acquérir de plus en plus de connaissances permettant de le valider de manière plus robuste.

### iv) Autre enseignement : choix de la phase à étudier (gastrique ou gastro-intestinale)

Concernant les phases des tests à réaliser, au vu des résultats recensés, il apparaît que pour les éléments inorganiques, notamment cationiques tels que le plomb et le cadmium :

- la biodisponibilité gastrique est supérieure à la biodisponibilité intestinale quelque soit le test et les sols étudiés,
- les corrélations dans la phase gastrique sont, en général, meilleures ( $r^2$  plus élevés) que dans la phase intestinale,
- les coefficients de variation de la répétabilité et reproductibilité intra- et inter laboratoire sont plus satisfaisants (plus faibles) dans les phases gastriques.

Certains auteurs préconisent de retenir les résultats de bioaccessibilité obtenus dans la phase gastro-intestinale. En effet, ceux-ci ont pour objectif de s'approcher au maximum des conditions physiologiques, afin de ne pas surestimer la fraction de polluant susceptible d'atteindre la circulation du sang (13). Toutefois, dans la majorité des cas, les résultats des études de corrélation et la comparaison des valeurs obtenues dans les tests *in vitro* et *in vivo*, montraient que la bioaccessibilité en phase gastro-intestinale était :

- soit similaire à la biodisponibilité (50% des équations avec  $r^2 > 0,6$ ),
- soit inférieure à la biodisponibilité (45% des équations avec  $r^2 > 0,6$ ), mettant en évidence une potentielle sous estimation de la biodisponibilité si le résultat brut issu du test *in vitro* est utilisé.

Ces observations conduisent donc à considérer que la phase gastrique pourrait être suffisante pour étudier la bioaccessibilité des éléments inorganiques cationiques, tels que le plomb et le cadmium, ce qui permettrait de limiter les coûts (même si une division par 2 ne doit, *a priori*, pas être attendue).

Pour l'arsenic, même si les différences de bioaccessibilité entre phases gastrique et gastro-intestinale semblent moins marquées, les remarques énoncées pour les éléments cationiques restent *a priori* valables. Par exemple, les corrélations des résultats du test UBM à des données *in vivo* obtiennent des  $r^2$  plus élevés dans la phase gastrique que dans la phase gastro-intestinale selon les deux études de Caboche (18) et Wragg *et al.* (69) (voir Tableau 27).

**Tableau 27 : Rappel des coefficients  $r^2$  obtenus pour les droites de corrélations entre les résultats du test UBM et les biodisponibilités mesurées *in vivo*, pour l'arsenic.**

Arsenic	Ratio liquide : solide	$r^2$	$r^2$
		Phase gastrique	Phase intestinale
Caboche (18)	100/1	0,98	0,97
Wragg <i>et al.</i> (69)	100/1	0,77	0,63
	1000/1	0,91	0,83

La phase intestinale pourrait néanmoins être pertinente pour l'arsenic si des étapes et mesures complémentaires étaient engagées, notamment l'introduction d'une flore microbienne avec une identification de métabolites actifs, telles que les formes méthylées de l'arsenic ayant un potentiel toxique significatif (55).

A l'inverse, pour les raisons déjà évoquées (notamment l'amélioration de la solubilisation en présence des composants des solutions intestinales), une phase intestinale est indispensable pour l'étude de la bioaccessibilité des molécules organiques.

## v) Synthèse

**D'après les trois aspects i) de pertinence du protocole au regard de la faisabilité technique et de sa représentativité physiologique, ii) de corrélation des résultats *in vitro* et *in vivo* et iii) des critères de répétabilité/reproductibilité, le test UBM et les essais qui en sont proches (RIVM avec ou sans nourriture et Forehst) semblent être les essais remplissant le plus grand nombre de critères de validité.**

Malgré cela, des travaux de recherche et acquisition de connaissances doivent être poursuivis afin d'améliorer les protocoles d'essais de bioaccessibilité *in vitro*. Il semble en effet nécessaire de consolider les modes opératoires afin de s'approcher aux mieux des résultats de biodisponibilité *in vivo*, et de vérifier pour quels polluants ils peuvent être plus spécifiquement employés, éventuellement pour quels sols, et selon quelle phase (gastrique ou gastro-intestinale).

Il faut également souligner que le test RBALP reste le test de choix aux Etats-Unis pour estimer la bioaccessibilité du plomb dans les sols. Il est également en cours de validation pour l'arsenic. En effet, des auteurs ont validé cet essai en estimant que l'erreur qu'il fournit est de 20%. A noter toutefois que, malgré sa simplicité (phase gastrique uniquement), il nécessite un appareillage lourd (verrerie de volume important à placer dans un bain thermostaté avec système de rotation).

D'autres procédures simples, avec ou sans mise en conditions physiologiques, semblent pouvoir également émerger au regard des résultats obtenus pour le plomb et l'arsenic dans l'étude BARC de 2011. En effet, ces procédures ont fourni (pour un sol de référence) des valeurs plus proches (ou plus élevées, donc plus sécuritaires) que les tests plus complexes. Toutefois ces procédures ont été largement moins étudiées et n'ont en particulier pas fait l'objet de travaux de comparaison/corrélation *in vitro/in vivo* intégrant plusieurs sols, ce qui représente une étape fondamentale de validation d'un test.

D'une façon générale, si les tests deviennent plus répétables et reproductibles, il est possible que les corrélations mises en évidence s'améliorent également et ne souffrent plus de certains biais.

Enfin, au vu des droites de corrélations *in vivo* / *in vitro* établies dans la bibliographie, et des résultats de bioaccessibilité obtenus lors de tests interlaboratoires (tels que ceux menés par le groupe BARC en 2011 : cf Figure 24), il apparaît que, dans une proportion non négligeable de cas (45%), les résultats fournis par les essais *in vitro* (mesurant la bioaccessibilité) sont inférieurs aux résultats *in vivo* (mesurant la biodisponibilité), alors qu'il était, en théorie, attendu l'inverse. Deux explications apparaissent : soit il s'agit d'un biais, et c'est souvent le cas avec les corrélations A/R (65% des cas), ce biais étant alors d'autant plus marqué dans la phase gastro-intestinale (69% des cas A/R), soit il s'agit d'une véritable sous-estimation, ce qui est le cas pour les corrélations R/R (35 % des cas). Une troisième possibilité, dans le cas de corrélations A/R, est le cumul d'un biais et d'une véritable sous-estimation. L'emploi d'un résultat brut de bioaccessibilité issu d'un test *in vitro* (quel qu'il soit) semble donc devoir se faire avec une grande prudence scientifique.

Enfin, il faut souligner que l'analyse des travaux et des résultats présentée ici a été réalisée de manière la plus objective possible, sans aucun préjugé ou avis préconçu concernant tel ou tel type de méthode avant le démarrage. Néanmoins, l'analyse critique peut souffrir de certains biais, liés notamment aux efforts de recherche plus ou moins importants mis en œuvre pour chaque essai, certains ayant bénéficié de travaux de plus grande ampleur. C'est le cas avec le test UBM qui a fait l'objet en France de la thèse de recherche de Caboche (18) à l'origine des principaux résultats, et qui bénéficie également d'un effort de consensus de nombreuses équipes européennes.

## **V.1.2. Faisabilité méthodologique**

### **V.1.2.1 Quelles données utiliser ?**

La valeur de bioaccessibilité, et donc de biodisponibilité relative, est dépendante de divers paramètres (test utilisé, type de sol, contaminant, origine de la pollution, etc) et peut prendre une infinité de valeur en fonction de ceux-ci. Par conséquent, il ne semble pas adéquat d'utiliser des données de biodisponibilité relative issues de la littérature pour ajuster les calculs de risque. En effet, il n'apparaît pas vraisemblable d'obtenir la même combinaison de données (même sol, même source, etc) entre une étude publiée et le cas spécifique du site étudié. Néanmoins dans le cadre d'une approche semi-quantitative, l'utilisation d'une bioaccessibilité d'origine bibliographique pourra être envisagée en analyse d'incertitude sous réserve d'une discussion entre le client et/ou l'ARS et/ou la DREAL.

Plusieurs données d'entrée, en relation avec les paramètres sensibles de la bioaccessibilité énoncés précédemment, peuvent être à l'origine de la modélisation de la biodisponibilité relative :

- les données sur les caractéristiques physico-chimiques des sols, ces données étant obtenues à partir des tests chimiques simples classiquement réalisés dans les diagnostics de sols ;
- les données sur la répartition des différentes formes de la substance étudiée dans les phases porteuses du sol investigué, ces données pouvant être obtenues à partir de tests chimiques d'extractions séquentielles ;
- les données sur la bioaccessibilité toxicologique de la substance étudiée dans le sol investigué, ces données étant obtenues à partir de tests physiologiques *in vitro*.

Concernant les paramètres physico-chimiques des sols, les résultats des études tendent à montrer que même si des corrélations significatives sont mises en évidence, les paramètres sensibles de ces corrélations varient en fonction des études, des types de sols, et des substances. Il semble donc difficile d'établir une liste prédéfinie de paramètres à rechercher et étudier.

Concernant la spéciation/forme des substances, la distribution des contaminants au sein des différentes phases porteuses du sol (mesurée *via* des extractions séquentielles) semble être un paramètre plus robuste que les paramètres physico-chimiques pour expliquer la variation de la bioaccessibilité dans les sols, car elle dépend et englobe de nombreux paramètres, et notamment les paramètres physico-chimiques (18). Néanmoins, à l'heure actuelle, les données disponibles, et les équations associées, sont très peu nombreuses.

Par ailleurs, dans la grande majorité des cas, les données de disponibilité environnementale (caractéristiques des sols et de la substance) ne permettent pas d'estimer directement la biodisponibilité d'une substance, mais sa bioaccessibilité. Une étape supplémentaire de modélisation est donc à envisager si l'on souhaite obtenir la biodisponibilité du contaminant dans le sol étudié à partir de ces données.

**Il semble, qu'à ce jour, la meilleure estimation de la biodisponibilité relative soit celle faite sur la base des résultats des tests de mesure *in vitro* de bioaccessibilité.**

Concernant la bioaccessibilité toxicologique, plusieurs méthodes *in vitro* ont été développées pour prédire la biodisponibilité relative (BD rel ou RBD) d'un contaminant. Ces méthodes sont généralement basées sur la mesure *in vitro* de la bioaccessibilité et donc sur l'hypothèse selon laquelle l'absorption n'est pas limitante. Mais pour qu'un test *in vitro* soit efficace pour prédire la biodisponibilité d'un contaminant dans un sol, il est nécessaire d'établir une corrélation significative entre les données *in vivo* et les données *in vitro* pour un grand nombre de sols. Un nombre relativement limité d'études ont permis d'établir une corrélation entre la biodisponibilité relative *in vivo* et la bioaccessibilité *in vitro*. Pour les composés inorganiques, ces études sont centrées sur l'arsenic et le plomb. Quelques études émergent concernant d'autres composés inorganiques, comme le

cadmium et l'antimoine, mais les corrélations significatives sont peu nombreuses. Seul le test UBM montre une corrélation linéaire dans les deux compartiments physiologiques (gastrique et gastro-intestinal) pour 3 polluants inorganiques (plomb, arsenic et cadmium). Pour les composés organiques, quelques études ont été réalisées, cependant la corrélation mise en évidence s'appuie sur un faible nombre de sols, et les informations relatives à la corrélation sont parfois limitées. Selon Juhasz *et al.*, les tests *in vitro* actuels ne devraient pas être utilisés pour prédire la biodisponibilité relative des contaminants organiques dans les sols (4).

Enfin, il faut souligner que très peu de ces études s'appliquent pour une même substance et un même test, ce qui limite l'analyse critique de ces corrélations. Lorsque c'est le cas (même substance, même test), des variations notables peuvent apparaître entre les équations de corrélation (pente de droite, ordonnées à l'origine).

### V.1.2.2 Estimation du Facteur d'Absorption Relative (FAR)

Dans le contexte d'une évaluation des risques sanitaires associés à l'ingestion de sol, la biodisponibilité relative est le facteur qui permet d'ajuster de façon pertinente le calcul de la dose d'exposition en fonction de la matrice « sol » étudiée, au regard de la matrice de référence représentée par la matrice utilisée dans l'étude clé pour l'élaboration de la Valeur Toxicologique de Référence (VTR) :

Le facteur de biodisponibilité relative, ou fraction d'absorption relative (FAR), est ensuite introduit dans les calculs de risque. A noter qu'il est possible de rencontrer des valeurs de FAR supérieures à 100%.

Pour l'obtention du FAR, 2 méthodes peuvent être mises en évidence :

- à partir des équations de corrélation *in vitro/in vivo*, et donc de la biodisponibilité relative (BD rel) estimée sur la base de ces équations,
- à partir de la bioaccessibilité absolue issue d'un test *in vitro* (validé *in vivo*) puis estimation théorique du FAR.

Pour être dans la démarche de prudence scientifique régissant les EQRS, chaque méthode étudiée devrait toutefois présenter les conditions d'utilisation suivantes :

- à partir des équations de corrélation *in vitro/in vivo* : il est nécessaire de s'assurer de la similarité des matrices de référence et des modèles expérimentaux entre l'étude *in vivo* et l'étude toxicologique (BDrel  $\approx$  FAR),
- à partir de la bioaccessibilité absolue issue d'un test *in vitro* (valeur brute) puis estimation théorique du FAR : il est nécessaire de s'assurer que la valeur de bioaccessibilité issue du test ne soit pas sous-estimée. Pour se faire une analyse plus approfondie de l'équation de corrélation doit être menée.

## V-2. Propositions

### V.2.1. Analyse

Suite à cet état de l'art, certaines préconisations générales (plus ou moins valables quelque soit le test de bioaccessibilité considéré), peuvent être émises concernant la mesure de la bioaccessibilité. Elles concernent :

- **l'adaptation de la verrerie et du pré-traitement des échantillons** (en termes de séchage notamment) **en fonction de la nature des polluants étudiés** (inorganiques ou organiques),
- **la conduite au sein du laboratoire d'un certain nombre de réplicats** (3 à 5 au minimum) permettant de fournir une moyenne et une déviation standard. Ce nombre de réplicats peut être plus ou moins élevé en fonction :
  - de la verrerie nécessaire. Il paraît plus aisé de conduire un nombre de réplicats plus important dans des tubes à centrifuger utilisés dans les tests UBM/RIVM/FOREhST que dans des flacons de 500 mL par exemple nécessaires dans l'essai DIN,

- de la nature du polluant, l'incertitude liée à l'analyse chimique proprement dite étant variable en fonction des substances étudiées, et étant, en général, plus élevée pour les molécules organiques,
  - de la nature des sols, des formes présentes ainsi que des concentrations totales en substances étudiées. Il pourrait effectivement être envisagé, dans le cas de sols avec des formes connues pour être peu bioaccessibles (sous réserve de disposer de ces informations), d'augmenter le nombre de réplicats afin de s'assurer des résultats risquant d'être à des niveaux faibles, (les incertitudes des analyses augmentant lorsque les concentrations diminuent et s'approchent des limites de quantification des méthodes),
- **le fait d'envisager de conduire des essais avec des ratios L/S plus élevés que ceux préconisés dans les protocoles de base.** En effet, des études (56)(69) ont montré que les tests RIVM et UBM fournissaient des valeurs plus proches des résultats de biodisponibilité, et plus reproductibles, lorsque le ratio employé était plus élevé (1000/1) que celui classiquement utilisé (100/1). Des auteurs (13) soulignent toutefois les possibles inconvénients de l'emploi d'un ratio plus élevé. En effet pour atteindre ce ratio, des quantités faibles de sols sont introduites (0,06 g, contre 0,6 g avec le ratio classique du test RIVM), ce qui peut entraîner une augmentation de la fréquence des résultats :
  - non représentatifs du sol étudié, surtout s'il est hétérogène,
  - non quantifiables (teneurs inférieures aux limites de quantification).
 Conduire en parallèle des réplicats avec le ratio 100/1 et d'autres avec le ratio 1000/1 pourrait donc s'avérer pertinent,
- **le contrôle strict du pH en fin de phase gastrique**, voire la réduction des variations autorisées par les protocoles actuels. Le pH est effectivement un paramètre majeur influençant les résultats, et un contrôle plus strict du pH gastrique pourrait améliorer la reproductibilité inter-laboratoires de l'essai, ce qui pourrait conduire à améliorer également la corrélation avec les résultats *in vivo* (69). Les résultats de Grøn (19) pour le plomb confirment cela : en effet la corrélation des résultats du test RIVM a été nettement améliorée lorsque des sols ayant induit des pH trop élevés (>1,8) en fin de phase gastrique ont été éliminés pour établir la droite de régression linéaire ( $r^2 = 0,758$ , alors que sans exclusion de sol aucune corrélation significative n'était mise en évidence avec un  $r^2 = 0,138$ ) (cf. Tableau 9, section IV-2). De même, tandis que Wragg *et al.* autorisaient un pH de 1,5+/-0,2 en phase gastrique, Caboche (18) a autorisé un pH gastrique de 1,2+/-0,05, et Pelfrène *et al.* (88) un pH gastrique de 1,5+/-0,05.
- **la conduite en parallèle de réplicats avec et sans aliment.**  
**Pour les molécules inorganiques**, même si les auteurs indiquent que les essais représentant les conditions à jeun maximisent la bioaccessibilité des éléments inorganiques (52), des résultats ont toutefois révélé que, dans certains cas, même pour ces éléments, la nourriture participait à augmenter les teneurs bioaccessibles (68)(54). Dans ce cas, il faudrait également discuter du pH de la phase gastrique. Celui-ci, en présence de nourriture, doit-il être maintenu à des valeurs faibles ou peut-il être plus élevé, à l'instar de ce qui se déroule physiologiquement ?  
**Pour les molécules organiques**, les réplicats avec aliments semblent suffisants. Ceci mériterait toutefois d'être confirmé, un nombre plus faible d'études ayant été réalisé sur ces molécules. Il serait aussi nécessaire de valider quelle nourriture employer. Le lait, peut représenter un aliment intéressant. En effet, dans un contexte d'évaluation des risques sanitaires liée à l'ingestion de sol par des enfants, le lait représente un aliment du régime alimentaire de ceux-ci et, comme indiqué dans la norme DIN, il est homogène dans sa composition et facile d'accès. Les procédures RIVM et FOREhST ont utilisé de la nourriture pour bébé enrichie en huile. Il serait certainement utile d'évaluer si des différences marquées de bioaccessibilité sont observées avec ces deux types de nourriture. Selon les résultats, réaliser des réplicats avec des aliments différents pourrait être envisagés,
- **le recours de façon systématique à des sols de référence** analysés en parallèle des échantillons. Ceci permettrait effectivement, au regard des résultats attendus pour ces sols de référence, de valider la série analytique par le laboratoire. Le sol de référence NIST 2710 semble avoir été le plus employé dans des études de bioaccessibilité. Il correspond à un sol du Montana séché et tamisé, fortement contaminé en éléments traces métalliques pour lequel

les teneurs totales sont certifiées<sup>35</sup>. Le sol NIST 2711 a également été employé. Il est, pour certains éléments métalliques (ex : le plomb), moins contaminé que le précédent. Toutefois pour ces sols, les spéciations des éléments métalliques ne sont pas renseignées. Etant donné l'influence majeure de la spéciation des éléments sur les résultats de bioaccessibilité, il serait indispensable d'inclure l'analyse de sols de référence différents (spéciations des éléments, nature, niveaux de concentrations). Pour les molécules organiques, de la même manière, restent à identifier des sols de référence à intégrer dans les séries analytiques (par famille organique par exemple). Une alternative serait de définir une procédure de dopage d'un (de) sol(s) connu(s),

- **la vérification que les teneurs totales soient disponibles pour la fraction qui va être analysée** dans le test de bioaccessibilité (en particulier la fraction <250 µm), et, ainsi, de pouvoir calculer le pourcentage de bioaccessibilité sur des bases solides et comparables. *A priori*, dans certains travaux, la bioaccessibilité semble réalisée sur la fraction <250 µm tandis que les teneurs totales semblent mesurées sur le sol total.

A noter qu'à l'échelle de la France, l'implication du groupe AFNOR, participant à l'élaboration de la norme EN ISO 17402 « Qualité du sol - Lignes directrices pour la sélection et l'application des méthodes d'évaluation de la biodisponibilité des contaminants dans le sol et les matériaux du sol », permettrait d'accélérer l'évaluation des points évoqués ci-dessus, *via*, par exemple, l'organisation d'essais inter-laboratoires destinés à valider une (des) procédure(s).

## V.2.2. Méthodologie

Comme vu précédemment, la meilleure estimation du FAR est obtenue à partir des résultats des tests *in vitro* de bioaccessibilité, préférentiellement selon le test UBM et les essais qui en sont proches (RIVM avec ou sans nourriture et Forehst). Le logigramme présenté en Figure 25 synthétise comment intégrer ce FAR dans les évaluations de risques sanitaires. Il est établi en l'état actuel des connaissances et devra être adapté à mesure de l'avancée des nouvelles recherches. De ce fait certaines étapes sont sujettes à incertitude (zones roses sur le logigramme). L'étude du logigramme constitue en elle-même un préalable à la démarche, ceci afin d'avoir une vue d'ensemble et de mieux orienter les réflexions, notamment au moment des investigations.

La première étape du logigramme (retrouvée également dans la majorité des publications étudiées) consiste à déterminer la pertinence de conduire une étude de bioaccessibilité spécifique au site. Elle permet d'écarter d'emblée les situations pour lesquelles l'utilisation de la bioaccessibilité en vue d'estimer un risque n'apportera aucun avantage majeur (voie prépondérante inhalation, risque dispersé par exemple). Actuellement, l'utilisation de la bioaccessibilité dans les évaluations de risque sanitaire ne semble pas être à utiliser de manière systématique. Les étapes schématisées en vert sur le logigramme sont celles précédant la réalisation du test de bioaccessibilité. L'introduction des notions de bioaccessibilité et biodisponibilité n'engendre pas fondamentalement de changement aux étapes de diagnostic (initial et approfondi), par rapport à ce qui est actuellement fait en pratique. Néanmoins, il faut souligner deux recommandations : éviter les échantillons composites, et, le cas échéant, rechercher des informations relatives aux formes et spéciations des éléments inorganiques en présence, par exemple, grâce à des extractions séquentielles.

Une première zone d'incertitude dans ce logigramme (zone d'incertitude n°1 sur le logigramme) concerne la mesure de la spéciation, *via* des extractions séquentielles. Pour que l'étude de la forme du contaminant au sein des phases porteuses du sol apporte les informations nécessaires à son utilisation en termes de bioaccessibilité/biodisponibilité, il apparaît nécessaire que les données issues des extractions séquentielles concordent avec les « classes de spéciation » déterminées dans les études issues de la littérature (par exemple les fourchettes de biodisponibilité proposées par l'US EPA pour l'arsenic ou le plomb en fonction de leur forme respective). Par ailleurs, il est nécessaire de s'assurer de la validité des tests par extraction séquentielle avant de proposer leur utilisation systématique. En effet, les techniques d'extractions séquentielles font l'objet de nombreuses critiques dans la littérature, mettant en avant plusieurs inconvénients de la technique (notamment un manque de sélectivité des extractants, et une ré-adsorption des espèces solubilisées (18)).

<sup>35</sup> Informations relatives aux sols de référence NIST 2710 et 2711 : [http://ts.nist.gov/MeasurementServices/ReferenceMaterials/archived\\_certificates/2710%20January%202018.%202002.pdf](http://ts.nist.gov/MeasurementServices/ReferenceMaterials/archived_certificates/2710%20January%202018.%202002.pdf) (consulté le 22/09/2011).

Si les données de spéciation ou forme indiquent une bioaccessibilité *a priori* faible, deux questions importantes se posent ensuite :

- les délais et les coûts engendrés par la prise en compte de la bioaccessibilité se justifient-ils comparativement aux coûts de réhabilitation estimés *a priori* ?
- existe-t-il un test validé *in vivo* pour le traceur de risque étudié ?

Si la réponse à l'une des ces deux questions est négative, il ne semble donc pas pertinent, ou possible, de mesurer spécifiquement une bioaccessibilité. En revanche, certaines données issues du diagnostic complémentaire peuvent orienter les évaluateurs vers la donnée issue de la littérature la mieux adaptée au site (même spéciation, même profil). Cette solution, étant cependant source d'incertitudes majeures relatives à la spécificité du site, elle devra être discutée avec tous les acteurs de l'évaluation de risque. Si le degré d'incertitude est jugé trop significatif, le calcul de risque ne pourra être ajusté, et un FAR égal à 100% sera utilisé.

Au global, l'intégration des notions de bioaccessibilité et biodisponibilité dans une EQRS pourra se faire de deux façons :

- soit il est possible d'utiliser la bioaccessibilité dans l'étude principale de l'EQRs du fait d'une valeur jugée représentative et/ou sécuritaire. Dans ce cas, les mesures de gestion seront directement dépendantes du résultat du calcul de risque intégrant le FAR ;
- soit, du fait de certaines incertitudes persistantes (notamment vis-à-vis d'une sous-estimation potentielle du FAR), la bioaccessibilité ne sera intégrée qu'au niveau de l'analyse des incertitudes de l'EQRs. De ce fait, le calcul de risque n'intégrera pas d'emblée le FAR, et l'établissement des mesures de gestion nécessitent alors une discussion avec tous les intervenants du projet (client, administrations,...).

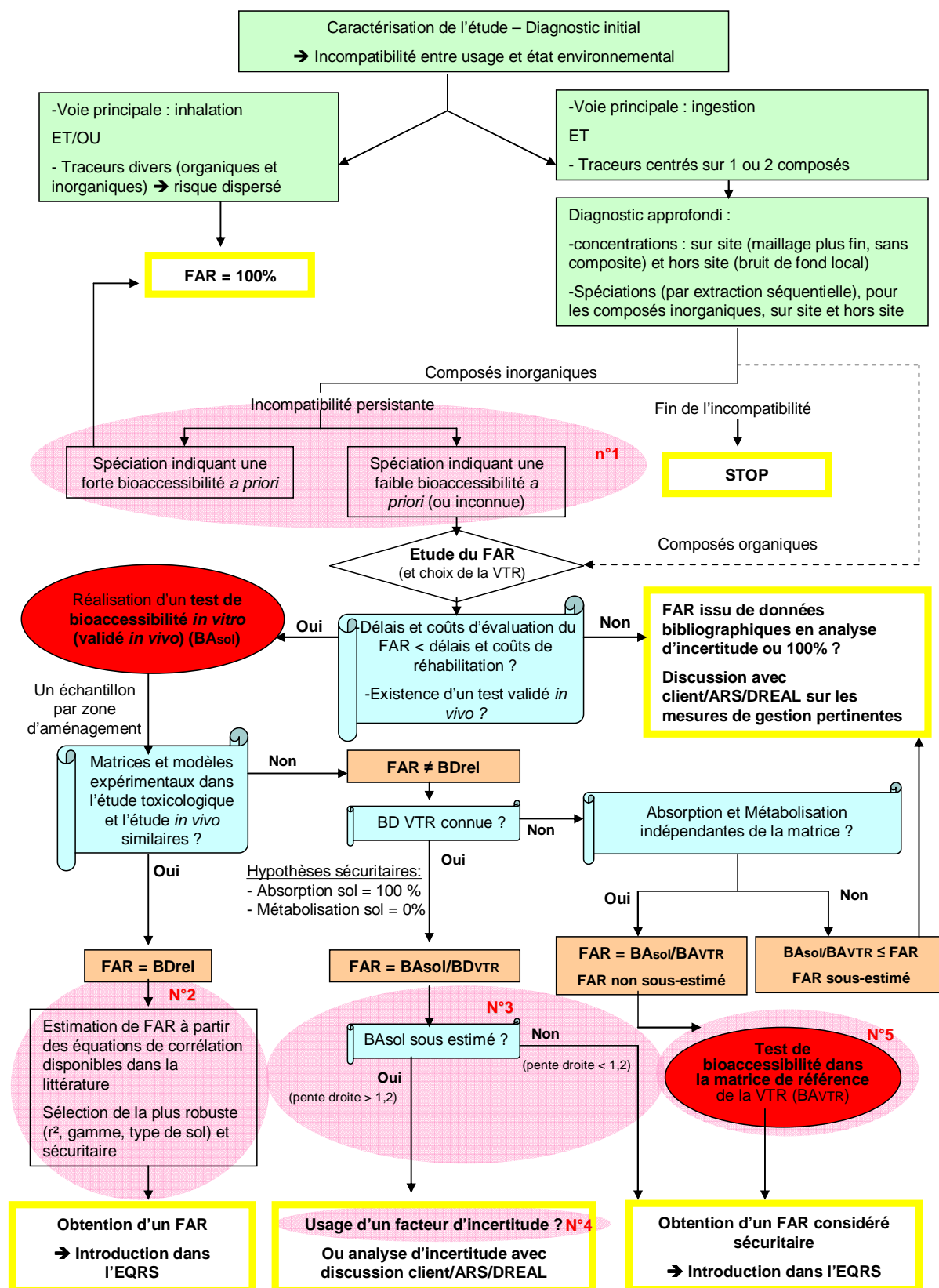


Figure 25 : Logigramme de décision pour l'intégration de la bioaccessibilité dans les évaluations de risques sanitaires



S'il existe, pour la substance étudiée, un test de mesure de la bioaccessibilité *in vitro* validé *in vivo*, celui-ci est donc conduit au laboratoire afin d'estimer la valeur de bioaccessibilité (les étapes expérimentales sont indiquées en rouge sur le logigramme).

D'une façon générale, deux cas de figures peuvent se présenter :

- **modèles expérimentaux et matrices de référence identiques ou similaires entre l'étude *in vivo* et l'étude toxicologique** → calcul possible et direct du FAR à partir de l'équation de corrélation associé au test utilisé (BD rel = FAR). A noter toutefois qu'il peut exister, pour un même test, plusieurs équations de corrélation, variables en fonction des auteurs et des études, et ce malgré une large gamme de sols étudiés. A ce jour, peu d'équations existent pour un même test, mais à l'avenir, les données bibliographiques risquent d'être plus importantes. Quelle équation choisir (zone d'incertitude n°2) ? Dans un premier temps, il s'agira toujours d'étudier les critères de validité qui la caractérisent, c'est-à-dire les critères de représentativité physiologique du test (coefficient de corrélation, gamme étendue de valeurs, bonne répartition de ces valeurs sur la droite de corrélation, grande variabilité de sols étudiés,...). Si toutes les équations disponibles pour le test mis en œuvre sont de bonne qualité, le choix de la plus sécuritaire peut être privilégié, c'est-à-dire l'équation aboutissant au FAR le plus élevé.
- **modèles expérimentaux et matrices de référence différents entre l'étude *in vivo* et l'étude toxicologique** => le calcul du FAR sur la base de l'équation de corrélation est impossible (BD rel  $\neq$  FAR), en revanche, la ou les équation(s) apportera(ont) les renseignements nécessaires pour estimer la potentielle sous ou surestimation de la bioaccessibilité issue du test. Dans ce cas, l'utilisation de la valeur de bioaccessibilité absolue directement issue du test *in vitro* peut être envisagée, sous certaines réserves :
  - **Le test *in vitro* utilisé devra être, au préalable, validé *in vivo*** selon les critères déjà énoncés précédemment ;
  - **Si la biodisponibilité de la substance dans la matrice de référence (VTR) est connue** (disponible dans la bibliographie), elle peut être directement introduite dans le calcul du FAR, en posant comme hypothèse sécuritaire que les fractions absorbée et non métabolisée du contaminant dans les sols sont de 100% (BD sol = BA sol).

Néanmoins, considérant que ce calcul se fonde sur le résultat brut du laboratoire, et qu'une sous-estimation potentielle de la valeur de bioaccessibilité existe (zone d'incertitudes n°3), il est nécessaire de s'assurer de la validité de la valeur brute de bioaccessibilité issue du test, en étudiant les équations de corrélation associées au test mis en œuvre (pente et ordonnée à l'origine de la droite) :

- pour une pente > 1,2 : sous-estimation potentielle de la bioaccessibilité si l'équation de corrélation est de type R/R
- pour une pente < 1,2 : bonne représentativité (entre 0,8 et 1,2) voire surestimation potentielle (< 0,8) de la bioaccessibilité si l'équation de corrélation est de type R/R.

Ceci en considérant le cas idéal où l'ordonnée à l'origine est significativement non différente de 0 (les équations fournies par les auteurs devront donc être accompagnées de cette mention).

A ce titre, dans le cadre d'une sous-estimation potentielle, le logigramme propose d'utiliser des facteurs d'incertitude, à l'instar de ceux utilisés pour la construction des VTR (zone d'incertitudes n°4). Néanmoins, bien que certains auteurs suggèrent cette solution, la valeur à attribuer à ce facteur d'incertitude n'est pas définie et des recherches doivent encore être menées afin de déterminer une valeur pertinente et cohérente (voir chapitre VI).

Pour les équations de type A/R, il est difficile d'évoquer une surestimation ou une sous-estimation de la bioaccessibilité, car le comparatif est d'emblée déséquilibré. On parle alors de « biais ». Néanmoins, en affinant l'analyse, il apparaît deux cas de figure lors d'une corrélation A/R :

- Si la corrélation a été établie en phase gastrique, dans ce cas, la bioaccessibilité absolue du contaminant peut être équivalente à sa bioaccessibilité relative car la bioaccessibilité dans la matrice de référence est souvent proche de 100%. C'est le cas pour la majorité des polluants inorganiques dans la phase gastrique. L'équation de corrélation A/R peut donc être approximativement assimilée à une corrélation R/R, et on peut dans ce cas évoquer les cas de sur- ou sous-estimation en fonction de la valeur de la pente de la droite.
- Si la corrélation a été établie en phase gastro-intestinale, dans ce cas, la bioaccessibilité absolue du contaminant ne peut pas être assimilée à sa bioaccessibilité relative, car la bioaccessibilité dans la matrice de référence peut être significativement inférieure à 100%. C'est le cas pour la majorité des polluants inorganiques cationiques (plomb, cadmium) dans la phase gastro-intestinale. L'équation de corrélation A/R ne peut donc pas être assimilée à une corrélation R/R. C'est dans ce cas précis que l'on parle de « biais ».

Par ailleurs, certaines des équations disponibles dans la littérature présentent des valeurs d'ordonnées à l'origine significativement différentes de 0. Lorsque la variation de l'ordonnée à l'origine va dans le même sens que la pente alors on peut conclure comme précédemment, selon les critères de pente. Lorsque la variation est contradictoire (exemple pente > 1,2 et ordonnée à l'origine << 0), il semble plus difficile d'affirmer *a priori* qu'elles conduisent à une sous ou une surestimation de FAR. Par conséquent, il ne semble pas conseillé d'utiliser ces équations « ambiguës ».

- **Si la biodisponibilité de la substance dans la matrice de référence (VTR) n'est pas connue** (inexistante dans la bibliographie) ; dans ce cas, il peut être envisagé de réaliser le test *in vitro* sur les sols et sur la matrice de référence de l'étude toxicologique relative à la VTR retenue. Il en résultera un ratio de bioaccessibilité relative. Un des avantages de ce ratio est que la sous-estimation potentielle de la valeur de bioaccessibilité (évoquée précédemment) portera sur les deux éléments de part et d'autre du ratio, engendrant une valeur de bioaccessibilité relative moins sujette à la sous-estimation. Néanmoins cette bioaccessibilité relative n'est pas entièrement le reflet du FAR. Pour que le FAR équivaille la bioaccessibilité relative, les processus d'absorption et de métabolisation doivent être indépendants de la matrice étudiée, ou que ces phénomènes soient moins significatifs à partir de la matrice sol par rapport à la matrice de référence (taux d'absorption et de métabolisation de la substance à partir du sol, respectivement inférieur et supérieur à ceux établis à partir de la matrice de référence). Si cette dernière hypothèse ne peut être démontrée, alors l'estimation du FAR à partir de la bioaccessibilité relative est incertaine (potentielle sous-estimation) impliquant, soit l'application d'un FAR de 100%, soit l'application, en analyse d'incertitude de l'EQRS d'une valeur bibliographique en relation avec la spéciation/forme de la substance observée sur site.

Sur ces bases, ainsi que celles évoquées dans le bilan de la partie « Analyse » (chapitre V.1.1.2), les méthodes d'estimation du FAR par polluant et par test sont synthétisées dans le tableau suivant.

Tableau 28 : Estimation du FAR par polluant et par test<sup>36</sup> (application du logigramme pour l'arsenic, le plomb et le cadmium)

Polluant	Tests de mesure <i>in vitro</i> retenus	Utilisation de l'équation de corrélation <i>in vivo</i> / <i>in vitro</i> ?	Equations disponibles ou autres alternatives ?	Commentaires
Arsenic	UBM	FAR = BD rel - BD ref = BD VTR <ul style="list-style-type: none"> <li>Matrice expérimentales similaires (solutions / eau de boisson)</li> <li>Modèle expérimental similaire (porcin/humain)</li> </ul> - Equation de corrélation valide ( $r^2$ , gamme étendue de valeurs, bonne répartition des valeurs, types de sols variés)	Caboche (18): $BDrel (\%) = BAc (\%) + 0,01$ (phase gastrique) $BDrel (\%) = 0,990 \times BAc (\%) - 0,039$ (phase gastro-intestinale)  Wragg (69) (ratio L/S = 1000) (ordonnées à l'origine estimées à partir du graphique) : $BDrel (\%) = 1,12 \times BAc (\%)$ (phase gastrique) $BDrel (\%) = 1,14 \times BAc (\%)$ (phase gastro-intestinale)	Toutes les équations corrént la biodisponibilité <b>relative</b> à la bioaccessibilité <b>relative</b> .  Etudier les équations et retenir la valeur de FAR la plus sécuritaire et/ou l'équation de corrélation la plus robuste.  A noter que selon les équations de Caboche et Wragg : $FAR = BDrel = BA rel$ (car pente $\approx 1$ et ordonnée à l'origine $\approx 0$ ) = $BA sol$ (car $BA ref \approx 100\%$ ).  <b>Ce qui conduit à l'équation théorique de l'INERIS : <math>BRrel = Bac</math></b>  <b>La bioaccessibilité peut être intégrée directement dans l'étude principale de l'EQRS.</b>
Cadmium	UBM RIVM	FAR = BD rel - BD ref = BD VTR <ul style="list-style-type: none"> <li>Matrice expérimentales similaires (solutions / eau de boisson)</li> <li>Modèle expérimental similaire (porcin/humain)</li> </ul> - Equation de corrélation valide	Caboche (18) (UBM) : $BDrel = 1,042 \times BAc rel (\%) - 2,771$ (phase gastrique) $BDrel = 1,064 \times BAc rel (\%) - 1,521$ (phase gastro-intestinale)  Wragg (69)(UBM) : $RBD (\%) = 1,59 \times BAc rel (\%) - 39$ (phase gastrique)	Toutes les équations corrént la biodisponibilité <b>relative</b> à la bioaccessibilité <b>relative</b> .  Etudier les équations et retenir la valeur de FAR la plus sécuritaire et/ou l'équation de corrélation la plus robuste.  Ici à bioaccessibilité relative équivalente, l'équation de Caboche en phase gastrique est plus sécuritaire que celle de Wragg, et l'équation de Gron en phase gastro-

<sup>36</sup> Au regard des tests sélectionnés au chapitre V.2.1 (test UBM et les essais qui en sont proches (RIVM avec ou sans nourriture et Forehst)

Polluant	Tests de mesure <i>in vitro</i> retenus	Utilisation de l'équation de corrélation <i>in vivo</i> / <i>in vitro</i> ?	Equations disponibles ou autres alternatives ?	Commentaires
		( $r^2$ , gamme étendue de valeurs, bonne répartition des valeurs, types de sols variés)	Grøn (19) (RIVM) : $BD_{rel} = 1,075 \times BA_{rel} (\%) - 0,042$ (phase gastro-intestinale)	<p>intestinale est plus sécuritaire que celle de Caboche.</p> <p>A noter toutefois que selon les équations de Caboche et de Grøn :</p> $FAR = BD_{rel} = BA_{rel}$ (car pente $\approx 1$ et ordonnée à l'origine $\approx 0$ ) = $BA_{sol}$ (car $BA_{ref} \approx 100\%$ ) <p><b>Ce qui conduit à l'équation théorique de l'INERIS : <math>BR_{rel} = B_{ac}</math></b></p> <p><b>La bioaccessibilité peut être intégrée directement dans l'étude principale de l'EQRS.</b></p>
Plomb	UBM	$FAR \neq BD_{rel}$ <ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>BD_{ref} \neq BD_{VTR}</math> <ul style="list-style-type: none"> <li>o Matrice expérimentales différentes (solutions / aliments)</li> <li>o Modèle expérimental similaire (porcin/humain)</li> </ul> </li> </ul>	$FAR = BA_{sol} / BD_{VTR}$ (Absorption = 100% et métabolisation = 0%) <ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>BD_{VTR}</math> disponible dans la littérature : 40 %</li> <li>- <math>BA_{sol}</math> apparaît potentiellement sous-estimée avec le test UBM, en particulier avec la phase gastro-intestinale</li> </ul> <p>Etude des équations de corrélation R/R (avec <math>r^2 &gt; 0,6</math>) :</p> <p>Caboche (18):  <math>BD_{rel} (\%) = 0,909 \times BA_{ac} (\%) - 1,691</math> (phase gastrique)  <math>BD_{rel} (\%) = 0,917 \times BA_{ac} (\%) - 1</math> (phase gastro-intestinale)</p> <p><b>=&gt; pente &lt; 1,2</b></p>	<p>Autres possibilités :</p> <p>* Cas 1 :  <math>FAR = BA_{rel} = BA_{sol} / BA_{VTR}</math> (mesurer -via l'UBM- <math>BA_{sol}</math> et <math>BA_{VTR}</math> en parallèle, afin de réduire la potentielle sous-estimation).  =&gt; hypothèses sous-jacentes à vérifier : absorption et métabolisation indépendantes de la matrice, ou fractions absorbée et non métabolisée moins importantes à partir des sols / matrice de référence  * métaux peu ou pas métabolisés  * absorption dépendante de la matrice (sol vs aliments ) du fait des compétitions entre <math>Pb^{2+}</math> et <math>Ca^{2+}</math>)  * absorption à partir des sols &lt; absorption à partir d'aliments ? =&gt; incertitudes</p> <p>Les hypothèses n'étant pas vérifiées, une sous-estimation potentielle du FAR demeure.</p> <p>* Cas 2 : utilisation d'un autre test <i>in vitro</i> de type RBALP / SBRC validé <i>in vivo</i> (phase gastrique uniquement).</p>

Polluant	Tests de mesure <i>in vitro</i> retenus	Utilisation de l'équation de corrélation <i>in vivo</i> / <i>in vitro</i> ?	Equations disponibles ou autres alternatives ?	Commentaires
			<p>Wragg (équations estimées à partir du graphique)  <math>BD_{rel} (\%) = 1,28 \times BAc (\%) + 13</math>  (phase gastrique)</p> <p><b>=&gt; pente &gt; 1,2</b></p> <p>Difficulté à conclure quant à la sous-estimation potentielle de Ba sol. L'étude interlaboratoire BARC 2011 (Figure 24) tend à démontrer qu'une sous-estimation est à envisager.</p>	<p>Etude des équations de corrélation A/R (avec <math>r^2 &gt; 0,6</math>) :</p> <p>Medlin, 1995  <math>BD_{rel} (\%) = 1,149 \times BAc (\%) - 7,816</math>  <b>=&gt; pente &lt; 1,2</b></p> <p>Gron <i>et al</i>, 2005 (124)  <math>BD_{rel} (\%) = 1,449 \times BAc (\%) - 0,406</math>  <b>=&gt; pente &gt; 1,2</b></p> <p>Drexler et Brattin, 2007 (94)  <math>BD_{rel} (\%) = 0,878 \times BAc (\%) - 0,028</math>  <b>=&gt; pente &lt; 1,2</b></p> <p>Pour une phase gastrique, l'équation de corrélation A/R peut donc être approximativement assimilée à une corrélation R/R. Ici encore, une sous-estimation ne peut être écartée.</p> <p><b>Il est donc conseillé d'étudier l'introduction du FAR en analyse d'incertitude de l'EQRS.</b></p>

Pour l'antimoine :

- l'utilisation de l'équation de corrélation *in vivo/in vitro* n'est pas envisageable à l'heure actuelle du fait, notamment, de la différence de modèle animal,
- en théorie, le FAR peut être estimé de façon théorique sur la base d'un test de mesure de la bioaccessibilité *in vitro* (valeur brute), si l'on peut démontrer que la valeur obtenue à l'issue du test n'est pas sous-estimée au regard de la biodisponibilité relative mesurée *in vivo*. Or, à ce jour, aucun test *in vitro* n'a été validé par rapport aux résultats *in vivo* pour l'antimoine. Les données étant insuffisantes, aucune méthode n'apparaît assez sécuritaire à ce stade.

Pour les HAP, les données sont trop peu nombreuses pour établir une corrélation robuste (44). De plus, des différences de matrices et de modèles animaux existent entre les études de biodisponibilité *in vivo* et les études de toxicité. De ce fait, aucune méthode d'intégration du FAR n'apparaît pertinente à ce stade.

## VI. AXES DE DEVELOPPEMENT ET DE RECHERCHE

### VI-1. La bioaccessibilité d'un contaminant par ingestion de sol

Comme vu dans les chapitres précédents, les équations de corrélation déterminées par les auteurs ne sont pas uniformes. Il est donc nécessaire d'approfondir les recherches sur les tests *in vitro* eux-mêmes en les validant systématiquement par rapport aux tests *in vivo*. D'une façon générale, si les tests deviennent plus répétables et reproductibles, il est probable que les corrélations mises en évidence s'améliorent également et ne souffrent plus de certains biais. A ce titre, il faudrait privilégier les études de corrélation R/R pour éviter tout biais d'interprétation. L'objectif doit être de permettre l'introduction de la valeur brute de bioaccessibilité (valeur issue du test *in vitro*) sans risque de sous-estimer la biodisponibilité du contaminant étudié.

Pour cela, il faudrait, dans le cadre des évaluations des risques sanitaires, coupler les études *in vivo* de corrélation avec les études de toxicité à l'origine des VTR. La similarité des matrices expérimentales et des modèles animaux permettraient ainsi d'envisager l'utilisation systématique des équations de corrélation pour l'évaluation du FAR. A ce titre, et en attendant un couplage systématique des études *in vivo/in vitro* avec les études de toxicité, il semble également intéressant d'initier une réflexion sur des valeurs de facteurs d'incertitude à appliquer au regard de l'ensemble des incertitudes associées aux résultats des tests *in vitro*, aux études de corrélation *in vivo/in vitro*, aux modélisations, etc.. Les valeurs arbitraires de 3, 5 et 10 utilisées comme facteur multiplicatif pour la construction des VTR ne semblent pas adéquates pour l'obtention d'un facteur correctif exprimé en pourcentage. Le facteur correctif, dans ce cas particulier, pourrait être plutôt l'ajout d'un pourcentage supplémentaire (par exemple : + 5% de la valeur obtenue à partir d'un test dont la matrice est différente de l'étude toxicologique, + 5% de la valeur obtenue pour tenir compte d'une variabilité inter-espèce, etc.).

Au regard des recherches bibliographiques réalisées pour cette étude, il apparaît que la majorité des données disponibles sont centrées sur les métaux et en particulier le plomb, l'arsenic et le cadmium. Il est donc nécessaire d'approfondir les connaissances pour les autres métaux, mais également pour les composés organiques, et ce d'autant que les données disponibles pour les composés inorganiques ne semblent pas complètement applicables aux composés organiques, tels que les HAP, les dioxines ou les furanes.

Comme vu précédemment, le postulat de base des études de corrélation *in vivo/in vitro* est que la bioaccessibilité du contaminant est le processus limitant de l'ensemble du processus de biodisponibilité. Sur ce point, il reste à développer les connaissances en toxicocinétique et toxicodynamie pour chaque polluant. C'est par la connaissance des processus physiologiques qui conduisent à un effet toxique que l'on pourra modéliser au mieux, et au plus juste, la toxicité des contaminants présents dans un sol.

C'est notamment le cas des composés organiques. Tao *et al.* suggèrent notamment que les tests de bioaccessibilité, tel qu'ils sont réalisés actuellement, sous-estiment la bioaccessibilité des composés organiques (97). En effet, les auteurs indiquent que, dans le test *in vitro*, une fraction des molécules solubilisées se réadsorbe à des particules de sol ou d'aliment, tandis que, dans les conditions physiologiques réelles, cette fraction adsorbée est susceptible de se désorber et, finalement, d'être disponible pour l'absorption. En effet, dans la réalité, l'absorption à travers la paroi intestinale conduit à un déplacement de l'équilibre (molécules dissoutes/molécules adsorbées) et à une désorption d'une certaine quantité de molécules. Or, dans les tests *in vitro*, l'absorption n'est pas mimée, et le déplacement de l'équilibre ne s'opère pas : les molécules restent adsorbées et ne sont pas comptabilisées dans la fraction solubilisée, d'où la sous-estimation potentielle de la bioaccessibilité des molécules organiques. Au-delà des composés organiques, ces processus associés aux gradients de concentration des molécules entre le tractus digestif et les cellules intestinales peut être à l'origine des biais observés dans les études de corrélation *in vivo/in vitro*. Une correction de ce biais devra être étudiée dans les recherches futures.

Ainsi, et en vu de tenir compte de la grande complexité des mécanismes physiologiques qui régulent le corps humain, des protocoles plus complexes pourraient être étudiés. Oomen *et al.* (98) ont réalisé le test RIVM sur un sol, et ont ensuite exposé le « digestat artificiel » obtenu à des cellules intestinales

humaines issues d'une culture *in vitro*<sup>37</sup>. Ceci permet, en plus de mimer la solubilisation dans le tractus digestif, de mimer le phénomène d'absorption (transport), l'absorption, étant un des processus fondamentaux de la biodisponibilité d'une substance. A noter que les auteurs n'ont, malheureusement, pas évalué les résultats obtenus par rapport à des données de biodisponibilité *in vivo*, mais ont bien constaté que seule une fraction bioaccessible du plomb était transportée au travers l'épithélium intestinal.

Ce type d'essai pourrait en particulier être valable pour les scénarios dans lesquels la solubilisation (la bioaccessibilité) n'est pas le facteur limitant de la biodisponibilité (scénarios 3 et 5 évoqués au chapitre IV-2).

Des efforts doivent donc être poursuivis concernant :

- Les données sur le comportement des polluants dans l'organisme humain (phénomènes de précipitation, de formation de micelles, d'absorption, de métabolisation, d'excrétion, etc. mentionnés par certains (99)(100)(101)).
- Les données sur la métabolisation des substances dans le tractus digestif d'une part, et dans le foie d'autre part, afin de tenir compte du potentiel toxique des métabolites issus de la molécule mère étudiée (cas de l'arsenic, cas des composés organiques particulièrement sujets à la métabolisation en métabolites actifs) ;
- La mise en place, notamment pour les composés organiques, de tests *in vitro* adaptés en développant des variantes incluant la présence d'aliments et/ou l'action de la flore microbienne, en conditions aérobie et anaérobie.

A l'inverse, et au vu des résultats obtenus avec les tests physiologiques les plus sophistiqués, il serait intéressant de ne pas négliger l'étude de certaines procédures simples avec ou sans mise en conditions physiologiques, et n'utilisant que très peu de réactifs chimiques. En effet, l'étude BARC 2011 (56) avait démontrée (mais pour un seul sol de référence) que certains protocoles simples fournissaient des valeurs plus proches (ou plus élevées) de la biodisponibilité du plomb et de l'arsenic. Ces méthodes peuvent donc fournir des valeurs plus sécuritaires que celles obtenues avec des essais plus complexes. Malheureusement des études de corrélation *in vivo/in vitro* manquent sur ce type d'essai.

Certains auteurs soulignent le fait que les tests doivent être adaptés à l'objectif qu'on leur assigne : une valeur sécuritaire, ou une valeur réaliste ? La réponse à cette question passe néanmoins par l'assurance, quel que soit le test utilisé et l'objectif recherché, de l'absence de sous-estimation potentielle de la réalité, impliquant, *a minima*, des études de corrélation *in vivo/in vitro* systématiques pour le test retenu, et au mieux, des études inter-laboratoires. Ces études devront démontrer la validité du test, sur la base des critères déjà développés par la communauté scientifique (et énoncés dans ce rapport), et potentiellement d'autres critères plus précis à développer à l'avenir pour faire facilement émerger les tests de haute qualité. Ensuite, le choix doit être orienté selon la substance étudiée, et l'objectif recherché :

- si le composé est inorganique, le choix d'un test simple mimant seulement la phase gastrique apparaît, à ce jour, le plus souvent sécuritaire. Le choix d'un test complexe, mimant les phases gastriques et gastro-intestinales, a l'avantage de présenter les résultats dans les deux phases, l'évaluation des risques pouvant alors être menée sur un plan plus large et plus réaliste ;
- si le composé est organique, le choix d'un test complexe, mimant les phases gastriques et gastro-intestinales, s'impose. Aujourd'hui le choix des tests éligibles est faible, mais à l'avenir les critères de sélection en termes de validité devront également s'appliquer pour ces molécules, en particulier lorsque des tests très sophistiqués impliquant une phase d'absorption auront été développés.

Les choix ont ici été présentés en fonction des deux grandes familles chimiques, néanmoins, il ne faut pas sous-estimer les caractéristiques propres à chaque substance, au sein d'une même famille chimique. En effet, certains auteurs ont pu montrer que les tests les mieux corrélés sont variables en fonction de la substance étudiée.

---

<sup>37</sup> Protocole nécessairement plus lourd que des tests de bioaccessibilité *in vitro*, moins lourds que des essais sur animaux, mais pas forcément moins coûteux.

Dans les deux cas, si le test possède des variantes, telles que mené à jeun ou en condition nourri, celles-ci peuvent être appliquées, élargissant encore la connaissance du polluant et ajustant l'interprétation de l'évaluateur.

Enfin, il faut noter ici que plus l'objectif recherché est de s'approcher de la réalité physiologique d'une valeur de biodisponibilité, plus le coût de l'étude sera vraisemblablement élevé. Ce critère de coût est donc, lui aussi, directement associé à l'objectif qu'on assigne à l'étude des risques sanitaires. Tout l'enjeu est que ce soit l'objectif de l'étude qui justifie un coût, et non l'inverse.

## VI-2. Application à d'autres milieux

La majorité des publications traite de la bioaccessibilité dans les sols proprement dits. Cependant certains auteurs ont fait remarquer que les différences entre les sols et les poussières peuvent conduire à des différences dans les résultats du test *in vitro*.

La validation des tests sur une matrice telle que les poussières n'a pas été réellement effectuée, très peu d'auteurs ayant réalisé des tests de bioaccessibilité *in vitro* sur les poussières. En effet, des difficultés peuvent être rencontrées lors de la prise en compte de cette matrice. Le premier écueil est que la masse nécessaire pour pouvoir réaliser des tests de bioaccessibilité est difficile à obtenir à partir de poussières intérieures. Le deuxième problème soulevé est que le sol et les poussières intérieures de la même résidence ont des « signatures géochimiques » différentes (77). La bioaccessibilité dans les poussières intérieures semble supérieure à celle dans les sols des jardins des résidences correspondantes (1). Tout comme les sols, l'importance de la spéciation, du contenu en carbone organique et de la phase minérale est soulignée.

La prise en compte de la voie orale dans les évaluations de risque sanitaire peut inclure l'ingestion de végétaux autoproduits. De ce fait, à l'instar de sols, il semble intéressant de développer les tests *in vitro* de bioaccessibilité pour des matrices telles que les légumes ou autres végétaux (phytobiodisponibilité), poissons, gibiers (facteurs de transfert), permettant une évaluation plus ajustée des risques associés à l'ingestion de ces matrices.

## VI-3. Application à d'autres voies : l'inhalation

Une recherche bibliographique rapide<sup>38</sup> a montré que très peu d'auteurs avaient étudié la possibilité de mettre en place des tests de bioaccessibilité pulmonaire, à l'image des tests de bioaccessibilité orale, en vue de déterminer la fraction des particules inhalées qui atteindrait la circulation sanguine après solubilisation dans les fluides pulmonaires (Julien 2011, Gray 2010, Beeston 2010, Wragg 2007, Twining 2005 ou encore Brock 2003).

Il existe d'ors et déjà des fluides de référence pour simuler les fluides pulmonaires tel que la solution de Gamble (102). Tout comme pour la voie orale, les conditions telles que le ratio L/S, le temps de résidence, le pH devront être définis. La particularité sera le degré d'oxygénation du système.

Cette approche permettrait donc d'ajuster également les calculs de risque relatifs à l'exposition par inhalation. Le recul vis-à-vis des tests pour la voie orale permet de recommander la réalisation d'emblée de validation *in vivo*. Cependant les tests *in vivo* par inhalation sont relativement lourds à mettre en place et imposent l'utilisation de systèmes de ventilation spécifiques.

## VI-4. La bioaccessibilité comme indicateur de dépollution

La présence de métaux comme le plomb sur un site à des niveaux de concentration entraînant des risques supérieurs au seuil de référence peut conduire à la mise en œuvre d'une excavation importante des terres. Or, comme il a été mentionné dans les chapitres précédents, la bioaccessibilité varie en fonction de la spéciation ou la forme de certains métaux. Une méthode de dépollution conduisant à une diminution pérenne de la bioaccessibilité peut donc être envisagée.

Certains auteurs évoquent cette technique (90)(103). Il s'agit d'ajouter, à un sol contaminé par du plomb, une quantité de phosphore afin de stabiliser *in situ* le système, et de rendre le plomb moins bioaccessible, et par conséquent moins biodisponible (90). L'efficacité de cette technique peut ensuite être vérifiée en effectuant des mesures de bioaccessibilité sur le sol traité.

---

<sup>38</sup> Sur Pubmed avec les mots clés : inhalation + bioaccessibility



Moseley *et al.* caractérisent alors une concentration cible à atteindre grâce à ce traitement par le phosphore (90) :

$C = K/B$ , avec  $C$  : concentration cible de dépollution,  $K$  : constante et  $B$  : biodisponibilité du contaminant

$C_A/C_U = 1/(B_A/B_U)$ ,  $A$  pour « post-amendement » (situation finale après dépollution) et  $U$  pour « non traité » (situation initiale avant dépollution)

Le critère retenu pour une action efficace est  $B_A/B_U \leq 0,75$ .

Dans cet exemple, la biodisponibilité est approchée par la bioaccessibilité.

Ce type de traitement est à ce jour essentiellement limité à une pollution par le plomb. De telles méthodes pourraient être élaborées pour d'autres composés (inorganiques et organiques), permettant éventuellement, à terme, de réduire les coûts de dépollution et limiter le bilan carbone (pas d'évacuation des terres en centre de traitement).

## VI-5. Disponibilité environnementale et biodisponibilité toxicologique

Comme évoqué précédemment, la disponibilité environnementale d'une substance associant les caractéristiques physico-chimiques des sols et de la substance considérée peut permettre d'apporter des informations pertinentes quant à la bioaccessibilité et biodisponibilité toxicologiques potentielles de cette substance. Une des pistes de recherche serait donc de développer ces modélisations, ce qui permettrait d'élargir le panel des études susceptibles d'intégrer les notions de bioaccessibilité et biodisponibilité.

Certains auteurs ont effectivement mis en évidence des corrélations robustes entre les résultats d'extractions séquentielles et ceux des tests *in vitro* de bioaccessibilité. Néanmoins, pour être utilisable en évaluation des risques, il serait pertinent de développer les études de corrélation entre les résultats de ces extractions séquentielles et la biodisponibilité obtenue *in vivo*.

## VII. CONCLUSION

Actuellement, les évaluations de risque considèrent, de façon sécuritaire, que la totalité d'une substance présente dans un sol ingéré par un individu, est biodisponible et atteindra donc ses organes cibles en générant un effet toxique. Afin d'ajuster les calculs de risque, et de tenir compte du fait qu'en réalité seule une fraction de la dose ingérée, variable selon le composé, atteint effectivement la circulation sanguine, il a été proposé d'y intégrer les notions de biodisponibilité et/ou bioaccessibilité.

L'objectif de cette étude était de dresser un état des connaissances sur les méthodes analytiques permettant de mesurer *in vitro* la bioaccessibilité, et les méthodes d'intégration du résultat de ces tests dans les évaluations de risque sanitaire afin de proposer une méthodologie.

Les essais biologiques de biodisponibilité peuvent être remplacés par des mesures chimiques de bioaccessibilité s'il a été démontré qu'elles prédisent raisonnablement la biodisponibilité des contaminants, c'est à dire s'il existe une corrélation linéaire suffisamment robuste entre la biodisponibilité *in vivo* et la bioaccessibilité *in vitro* (corrélation *in vivo/in vitro*).

A l'issue de cette étude, il apparaît que le test UBM et ceux qui en sont proches (RIVM et FOREhST) se distinguent des autres par leur représentativité physiologique (en termes de protocole et de résultat) et par la relative facilité de mise en oeuvre de leur protocole (temps, matériel, etc.). Néanmoins il faut souligner que certains tests simples comme SBRC/RBALP ont également montré des résultats probants et ont, à ce titre, été approuvés par certains organismes (USA, Australie).

Dans le contexte d'une évaluation des risques sanitaires associés à l'ingestion de sol, la biodisponibilité relative est le facteur qui permet d'ajuster de façon pertinente le calcul de la dose d'exposition. Ce facteur met en relation la matrice « sol » étudiée et la matrice de référence représentée par la matrice utilisée pour l'élaboration de la Valeur Toxicologique de Référence (VTR). Il est intitulé Fraction d'Absorption Relative (FAR).

Un logigramme d'action relatif à l'intégration de la FAR dans les EQRS est proposé dans cette étude. Deux cas de figure se présentent :

- si la matrice et le modèle expérimental de l'étude de corrélation *in vivo/in vitro* est identique ou similaire à ceux de l'étude toxicologique (associée à la VTR), l'équation de corrélation (issue de la validation *in vivo/ in vitro* du test) peut être utilisée directement pour calculer le FAR,
- dans le cas contraire, le FAR sera estimé *via* l'utilisation du résultat brut de bioaccessibilité (issu du test), sous réserve de rester sécuritaire (évaluation de la sous-estimation potentielle du FAR).

Au global, l'intégration des notions de bioaccessibilité et biodisponibilité dans une EQRS pourra se faire de deux façons :

- soit il est possible d'utiliser la bioaccessibilité dans l'étude principale de l'EQRS du fait d'une valeur de FAR jugée représentative et/ou sécuritaire. Et dans ce cas, les mesures de gestion seront directement dépendantes du résultat du calcul de risque intégrant le FAR ;
- soit, du fait de certaines incertitudes persistantes (notamment vis-à-vis d'une sous-estimation potentielle du FAR), la bioaccessibilité ne sera intégrée qu'au niveau de l'analyse des incertitudes de l'EQRS. De ce fait, le calcul de risque n'intégrera pas d'emblée le FAR, et l'établissement des mesures de gestion nécessitera alors une discussion avec tous les intervenants du projet (client, administrations,...).

Au vu des incertitudes entourant les notions de bioaccessibilité et biodisponibilité, de nombreuses recherches doivent donc encore être menées :

- validation plus large des protocoles *in vitro* par des études *in vivo*, notamment la validation des tests simples avec ou sans mise en conditions physiologiques ;
- étude d'autres polluants, notamment les composés organiques. En effet, les recherches ont principalement été conduites pour les composés inorganiques, en particulier le plomb, l'arsenic et le cadmium ;
- les données sur le comportement des polluants dans l'organisme humain, et notamment sur la métabolisation des substances afin de tenir compte du potentiel toxique des métabolites issus de la molécule mère étudiée.

Enfin, il convient de noter que plus on cherche à s'approcher de la réalité physiologique d'une valeur de biodisponibilité, plus le coût de l'étude sera vraisemblablement élevé. Ce critère de coût est donc directement associé à l'objectif qu'on assigne à l'étude des risques sanitaires (valeur sécuritaire ou valeur réaliste ?). A ce stade, des approfondissements sont encore nécessaires, tant du point de vue analytique (nombre de réplicats, intégration d'un sol de référence, etc.) que méthodologique, en vue d'établir un coût associé à l'introduction de ces notions de bioaccessibilité et biodisponibilité dans les évaluations de risque. Un complément d'étude pourra donc être ultérieurement mené sur cette thématique.

## Références bibliographiques

1. InVS, INERIS, BRGM, ICF. Ingestion de sol: état des connaissances et propositions. *A paraître*.
2. Caussy D. Case studies of the impact of understanding bioavailability: arsenic. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2003 sept;56(1):164–73.
3. AFNOR. PR NF EN ISO 17402 - Qualité du sol - Lignes directrices pour la sélection et l'application des méthodes d'évaluation de la biodisponibilité des contaminants dans le sol et les matériaux du sol. 2011 mars 11;
4. Ng J, Juhasz A, Smith E, Naidu R. Contaminant bioavailability and bioaccessibility - Part 1: A scientific and technical review. 2010 avr;
5. Peijnenburg WJ, Posthuma L, Eijsackers HJ, Allen HE. A conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 1997 juill;37(2):163–72.
6. Gimbert F. Cinétiques de transfert de polluants métalliques du sol à l'escargot. Université de Franche-Comté; 2006.
7. Semple KT, Doick KJ, Jones KC, Burauel P, Craven A, Harms H. Peer Reviewed: Defining Bioavailability and Bioaccessibility of Contaminated Soil and Sediment is Complicated. *Environmental Science & Technology*. 2004 juin 1;38(12):228A-231A.
8. AFNOR. Norme XP ISO/TS 17924 - Qualité du sol - Evaluation de l'exposition humaine par ingestion de sol et de matériaux du sol. 2008 mars;
9. INERIS. Biodisponibilité et spéciation: bilan sur les modèles BLM - Rapport DRC-09-102844-02073A. 2009;
10. Denys S, Dor F, Dabin C. Integration of the oral bioaccessibility of trace elements in the human exposure and risk assessment of contaminated soils. 2011;
11. Hosford M. Human health toxicological assessment of contaminants in soil. 2009;
12. Grøn C, Andersen L. Human Bioaccessibility of Heavy Metals and PAH from Soil. DHI; 2003.
13. Oomen A, Brandon E, Swartjes FA, Sips A. How can information on oral bioavailability improve human health risk assessment for lead-contaminated soils? Implementation and scientific basis. 2006.
14. Schoof RA. Bioavailability of Soil-Borne Chemicals: Method Development and Validation. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*. 2004;10(4):637.
15. Denys S, Caboche J, Feidt C, Hazebrouck B, Dor F, Dabin C, et al. Biodisponibilité et bioaccessibilité des métaux et métalloïdes des sols pollués pour la voie orale chez l'homme. *ERS*. 2009 oct;8(5):433–8.
16. Gravelier A. Biodisponibilité des métaux lourds dans les sols et impact de sa prise en compte dans les évaluations de risque sanitaire. Ecole Nationale de la Santé Publique; 2007.
17. Roberts SM. Incorporating Information on Bioavailability of Soil-Borne Chemicals into Human Health Risk Assessments. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*. 2004;10(4):631.
18. Caboche J. Validation d'un test de mesure de bioaccessibilité. Application à 4 éléments traces métalliques dans les sols: As, Cd, Pb et Sb. 2009;

19. Grøn C. Test for bioaccessibility of metals and PAH from soil - Test selection, validation and application. DHI; 2005.
20. Gaw SK, Kim ND, Northcott G, Wilkins AL, Robinson G. Developing site-specific guidelines for orchard soils based on bioaccessibility – Can it be done? [Internet]. [cité 2011 août 19]; Available from: <http://researchcommons.waikato.ac.nz/handle/10289/4568>
21. Schoof RA. Guide for Incorporating Bioavailability Adjustments into Human Health and Ecological Risk Assessments at US Department of Defense Facilities. 2003.
22. Latawiec AE, Simmons P, Reid BJ. Decision-makers' perspectives on the use of bioaccessibility for risk-based regulation of contaminated land. *Environ Int.* 2010 mai;36(4):383–9.
23. Juhasz AL, Weber J, Naidu R, Gancarz D, Rofe A, Todor D, et al. Determination of cadmium relative bioavailability in contaminated soils and its prediction using in vitro methodologies. *Environ. Sci. Technol.* 2010 juill 1;44(13):5240–7.
24. US EPA. Guidance for Evaluating the Oral Bioavailability of Metals in Soils for Use in Human Health Risk Assessment. US EPA; 2007.
25. Guney M, Zagury GJ, Dogan N, Onay TT. Exposure assessment and risk characterization from trace elements following soil ingestion by children exposed to playgrounds, parks and picnic areas. *J. Hazard. Mater.* 2010 oct 15;182(1-3):656–64.
26. US EPA. Estimation of relative bioavailability of lead in soil and soil-like materials using in vivo and in vitro methods. US EPA; 2007.
27. US EPA. Estimation of relative bioavailability of arsenic in soil and soil-like materials by in vivo and in vitro methods. 2005;
28. US EPA. Standard Operating Procedure for an In Vitro Bioaccessibility Assay for Lead in Soil. US EPA; 2008.
29. BARC. Webinar proceedings. 2010;
30. Hagens W., Walraven N, Minekus M, Havenaar R, Lijzen JP., Oomen A. Relative oral bioavailability of lead from Dutch made grounds - Report 711701086. 2009;
31. Whitford J. Ingestion bioavailability of arsenic, lead and cadmium in human health risk assessments: critical review, and recommendations. 2006.
32. Environment Agency. In-vitro Bioaccessibility Testing: Current Science and Way Forward (Environment Agency Science Update 2). 2007;
33. CIEH. Professional practice note: reviewing human health risk assessment reports invoking contaminant oral bioavailability measurements or estimates. 2009;
34. Wragg J, Cave M. In vitro methods for the measurement of the oral bioaccessibility of selected metals and metalloids in soils: a critical review. British Environment Agency; 2002.
35. Roussel H, Waterlot C, Pelfrène A, Pruvot C, Mazzuca M, Douay F. Cd, Pb and Zn oral bioaccessibility of urban soils contaminated in the past by atmospheric emissions from two lead and zinc smelters. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2010 mai;58(4):945–54.
36. Caboche J, Denys S, Feidt C, Delalain P, Tack K, Rycken G. Modelling Pb bioaccessibility in soils contaminated by mining and smelting activities. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 2010 août;45(10):1264–74.
37. BRGM G. Guide sur le comportement des polluants dans les sols et les nappes : Applications dans un contexte d'évaluation détaillée des risques pour les ressources en eau. Editions du BRGM; 2001.

38. Cornu S, Clozel B. Extractions séquentielles et spéciation des éléments trace métalliques dans les sols naturels. *Etude et Gestion des Sols*. 2000;179–89.
39. Smith E, Weber J, Juhasz AL. Arsenic distribution and bioaccessibility across particle fractions in historically contaminated soils. *Environ Geochem Health*. 2009 avr;31 Suppl 1:85–92.
40. Lu M, Yuan D, Lin Q, Ouyang T. Assessment of the bioaccessibility of polycyclic aromatic hydrocarbons in topsoils from different urban functional areas using an in vitro gastrointestinal test. *Environ Monit Assess*. 2009 mai;166(1-4):29–39.
41. Lu Y, Yin W, Huang L, Zhang G, Zhao Y. Assessment of bioaccessibility and exposure risk of arsenic and lead in urban soils of Guangzhou City, China. *Environ Geochem Health*. 2010 juin 4;
42. Poggio L, Vrscaj B, Schulin R, Hepperle E, Ajmone Marsan F. Metals pollution and human bioaccessibility of topsoils in Grugliasco (Italy). *Environ. Pollut*. 2009 févr;157(2):680–9.
43. INERIS. Intégration de la notion de bioaccessibilité dans la méthode d'interprétation de l'état des milieux. Illustration sur le site atelier de Saint Laurent le Minier - Rapport d'étude DRC-09-103753-13288A. 2009;
44. Juhasz A, Smith E, Weber J, Gancarz D. Predicting the relative bioavailability of arsenic, cadmium and lead via the incidental soil ingestion pathway using in vitro techniques. Brisbane, Australia: 2010.
45. Denys S, Tack K, Caboche J, Delalain P. Bioaccessibility, solid phase distribution, and speciation of Sb in soils and in digestive fluids. *Chemosphere*. 2009 févr;74(5):711–6.
46. Siciliano SD, Laird BD, Lemieux CL. Polycyclic aromatic hydrocarbons are enriched but bioaccessibility reduced in brownfield soils adhered to human hands. *Chemosphere*. 2010 août;80(9):1101–8.
47. Versantvoort C, Rempelberg C, Sips A. Methodologies to study human intestinal absorption. 2000;
48. Maddaloni M, Lolocono N, Manton W, Blum C, Drexler J, Graziano J. Bioavailability of soilborne lead in adults, by stable isotope dilution. *Environ. Health Perspect*. 1998 déc;106 Suppl 6:1589–94.
49. Smith DJ. Total radioactive residues and clenbuterol residues in swine after dietary administration of [<sup>14</sup>C]clenbuterol for seven days and preslaughter withdrawal periods of zero, three, or seven days. *J. Anim. Sci*. 2000 nov;78(11):2903–12.
50. Environment Agency. Environment Agency views on using in vitro bioaccessibility data in land contamination risk assessments for human health. 2007;
51. Oomen AG, Hack A, Minekus M, Zeijdner E, Cornelis C, Schoeters G, et al. Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. *Environ. Sci. Technol*. 2002 août 1;36(15):3326–34.
52. Cave MR, Wragg J, Harrison I, Vane CH, Wiele TV de, Groeve ED, et al. Comparison of batch mode and dynamic physiologically based bioaccessibility tests for PAHs in soil samples. *Environ. Sci. Technol*. 2010 avr 1;44(7):2654–60.
53. Schroder L, Basta NT, Casteel SW, Evans TJ, Payton ME, Si J. Validation of the in vitro gastrointestinal (IVG) method to estimate relative bioavailable lead in contaminated soils. *J. Environ. Qual*. 2004 avr;33(2):513–21.
54. Hagens W., Lijzen JP., Sips A, Oomen AG. The bioaccessibility and relative bioavailability of lead from soils for fasted and fed conditions. 2008;
55. Van de Wiele T, Gallawa CM, Kubachka KM, Creed JT, Basta N, Dayton EA, et al. Arsenic Metabolism by Human Gut Microbiota upon in Vitro Digestion of Contaminated Soils. *Environ*

56. BARC. Round robin experiment: variability of bioaccessibility results using seventeen different methods on a standard reference material (NIST 2710). 2011;
57. Rodriguez RR, Basta NT, Casteel SW, Pace LW. An In Vitro Gastrointestinal Method To Estimate Bioavailable Arsenic in Contaminated Soils and Solid Media. *Environmental Science & Technology*. 1999 févr 1;33(4):642–9.
58. James K, Peters RE, Laird BD, Ma WK, Wickstrom M, Stephenson GL, et al. Human exposure assessment: a case study of 8 PAH contaminated soils using in vitro digestors and the juvenile swine model. *Environ. Sci. Technol*. 2011 mai 15;45(10):4586–93.
59. Drexler JW, Brattin WJ. An In Vitro Procedure for Estimation of Lead Relative Bioavailability: With Validation. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*. 2007;13(2):383.
60. Ellickson KM, Meeker RJ, Gallo MA, Buckley BT, Lioy PJ. Oral bioavailability of lead and arsenic from a NIST standard reference soil material. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*. 2001 janv;40(1):128–35.
61. Hack A, Selenka F. Mobilization of PAH and PCB from contaminated soil using a digestive tract model. *Toxicol. Lett*. 1996 nov;88(1-3):199–210.
62. Basta NT, Foster JN, Dayton EA, Rodriguez RR, Casteel SW. The effect of dosing vehicle on arsenic bioaccessibility in smelter-contaminated soils. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*. 2007 juill 15;42(9):1275–81.
63. Oomen A. Determinants of oral bioavailability of soil-borne contaminants. Utrecht; 2000.
64. Ruby MV, Davis A, Schoof R, Eberle S, Sellstone CM. Estimation of Lead and Arsenic Bioavailability Using a Physiologically Based Extraction Test. *Environmental Science & Technology*. 1996 janv 1;30(2):422–30.
65. Ruby MV, Davis A, Link TE, Schoof R, Chaney RL, Freeman GB, et al. Development of an in vitro screening test to evaluate the in vivo bioaccessibility of ingested mine-waste lead. *Environmental Science & Technology*. 1993 déc 1;27(13):2870–7.
66. Sips AJAM, Bruil MA, Dobbe CJG, Van de Kamp E, Oomen AG, Pereboom DPKH, et al. Bioaccessibility of contaminants from ingested soil in humans: method development and research on the bioaccessibility of lead and benzo[a]pyrene. RIVM; 2001.
67. Hamel SC, Buckley B, Lioy PJ. Bioaccessibility of Metals in Soils for Different Liquid to Solid Ratios in Synthetic Gastric Fluid. *Environmental Science & Technology*. 1998 févr 1;32(3):358–62.
68. Van de Wiele TR, Oomen AG, Wragg J, Cave M, Minekus M, Hack A, et al. Comparison of five in vitro digestion models to in vivo experimental results: lead bioaccessibility in the human gastrointestinal tract. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*. 2007 juill 15;42(9):1203–11.
69. Wragg J, Cave M, Basta N, Brandon E, Casteel S, Denys S, et al. An inter-laboratory trial of the unified BARGE bioaccessibility method for arsenic, cadmium and lead in soil. *Sci Total Environ* [Internet]. 2011 juin 22 [cité 2011 juill 20]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21703664>
70. Holman H-YN, Goth-Goldstein R, Aston D, Yun M, Kengsoontra J. Evaluation of gastrointestinal solubilization of petroleum hydrocarbon residues in soil using an in vitro physiologically based model. *Environ. Sci. Technol*. 2002 mars 15;36(6):1281–6.

71. 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. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2003 avr;44(3):281–7.
72. Barnett MO, Turner RR. Bioaccessibility of Mercury in Soils. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*. 2001;10(3):301.
73. Paustenbach DJ. The practice of exposure assessment: a state-of-the-art review. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2000 sept;3(3):179–291.
74. Laird BD, Van de Wiele TR, Corriveau MC, Jamieson HE, Parsons MB, Verstraete W, et al. Gastrointestinal microbes increase arsenic bioaccessibility of ingested mine tailings using the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *Environ. Sci. Technol.* 2007 août 1;41(15):5542–7.
75. Hamel SC, Ellickson KM, Liroy PJ. The estimation of the bioaccessibility of heavy metals in soils using artificial biofluids by two novel methods: mass-balance and soil recapture. *Sci. Total Environ.* 1999 déc 15;243-244:273–83.
76. Ruby MV, Schoof R, Brattin W, Goldade M, Post G, Harnois M, et al. Advances in Evaluating the Oral Bioavailability of Inorganics in Soil for Use in Human Health Risk Assessment. *Environmental Science & Technology*. 1999 nov 1;33(21):3697–705.
77. Rasmussen PE, Beauchemin S, Nugent M, Dugandzic R, Lanouette M, Chénier M. Influence of Matrix Composition on the Bioaccessibility of Copper, Zinc, and Nickel in Urban Residential Dust and Soil. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*. 2008;14(2):351.
78. Girouard E, Zagury GJ. Arsenic bioaccessibility in CCA-contaminated soils: influence of soil properties, arsenic fractionation, and particle-size fraction. *Sci. Total Environ.* 2009 avr 1;407(8):2576–85.
79. Welfringer B, Zagury GJ. Evaluation of two in vitro protocols for determination of mercury bioaccessibility: influence of mercury fractionation and soil properties. *J. Environ. Qual.* 2009 déc;38(6):2237–44.
80. BARC. Workshop on bioaccessibility/bioavailability in contaminated site assessment an industry perspective. 2006;
81. Grøn C, Oomen A, Weyand E, Wittsiepe J. Bioaccessibility of PAH from Danish soils. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 2007 juill 15;42(9):1233–9.
82. Juhasz AL, Weber J, Smith E, Naidu R, Rees M, Rofe A, et al. Assessment of four commonly employed in vitro arsenic bioaccessibility assays for predicting in vivo relative arsenic bioavailability in contaminated soils. *Environ. Sci. Technol.* 2009 déc 15;43(24):9487–94.
83. Juhasz AL, Smith E, Weber J, Rees M, Rofe A, Kuchel T, et al. Comparison of in vivo and in vitro methodologies for the assessment of arsenic bioavailability in contaminated soils. *Chemosphere.* 2007 oct;69(6):961–6.
84. Juhasz AL, Weber J, Smith E, Naidu R, Marschner B, Rees M, et al. Evaluation of SBRC-gastric and SBRC-intestinal methods for the prediction of in vivo relative lead bioavailability in contaminated soils. *Environ. Sci. Technol.* 2009 juin 15;43(12):4503–9.
85. US EPA. Validation assessment of in vitro lead bioaccessibility assay for predicting relative bioavailability of lead in soils and soil-like materials at superfund sites. 2009;
86. Schroder L, Basta NT, Casteel SW, Evans TJ, Payton ME, Si J. Validation of the in vitro gastrointestinal (IVG) method to estimate relative bioavailable lead in contaminated soils. *J. Environ. Qual.* 2004 avr;33(2):513–21.



87. Pu X, Lee LS, Galinsky RE, Carlson GP. Evaluation of a rat model versus a physiologically based extraction test for assessing phenanthrene bioavailability from soils. *Toxicol. Sci.* 2004 mai;79(1):10–7.
88. Pelfrène A, Waterlot C, Mazzuca M, Nisse C, Bidar G, Douay F. Assessing Cd, Pb, Zn human bioaccessibility in smelter-contaminated agricultural topsoils (northern France). *Environ Geochem Health* [Internet]. 2010 déc 4 [cité 2010 déc 22];Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21132454>
89. Zagury GJ, Bedeaux C, Welfringer B. Influence of mercury speciation and fractionation on bioaccessibility in soils. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2009 avr;56(3):371–9.
90. Moseley RA, Barnett MO, Stewart MA, Mehlhorn TL, Jardine PM, Ginder-Vogel M, et al. Decreasing lead bioaccessibility in industrial and firing range soils with phosphate-based amendments. *J. Environ. Qual.* 2008 déc;37(6):2116–24.
91. Sarkar D, Makris KC, Parra-Noonan MT, Datta R. Effect of soil properties on arsenic fractionation and bioaccessibility in cattle and sheep dipping vat sites. *Environ Int.* 2007 févr;33(2):164–9.
92. Juhasz AL, Smith E, Weber J, Rees M, Rofo A, Kuchel T, et al. In vitro assessment of arsenic bioaccessibility in contaminated (anthropogenic and geogenic) soils. *Chemosphere.* 2007 août;69(1):69–78.
93. Yang J-K, Barnett MO, Zhuang J, Fendorf SE, Jardine PM. Adsorption, Oxidation, and Bioaccessibility of As(III) in Soils. *Environmental Science & Technology.* 2005;39(18):7102–10.
94. Onweremadu, Uhuegbu A. Chromium (III) in Relation to Soil Properties and Bioaccessibility in Soils Polluted by Animal Wastes. *Nature and Science.* 2007;5(2).
95. Agency E. Questionnaire Survey on the Use of In-vitro Bioaccessibility in Human Health Risk Assessment. Environment Agency; 2006.
96. INERIS. Hypothèses et recommandations pour l'intégration de la bioaccessibilité de l'arsenic et du cadmium dans le calcul de la dose d'exposition par ingestion de terre contaminée. 2010.
97. Tao S, Lu Y, Zhang D, Yang Y, Yang Y, Lu X, et al. Assessment of oral bioaccessibility of organochlorine pesticides in soil using an in vitro gastrointestinal model. *Environ. Sci. Technol.* 2009 juin 15;43(12):4524–9.
98. Oomen AG, Tolls J, Sips AJAM, Groten JP. In vitro intestinal lead uptake and transport in relation to speciation. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2003 janv;44(1):116–24.
99. Dufailly V. Spéciation de l'arsenic dans les produits de la pêche par couplage HPLC-ICP-MS après extraction assistée par micro-ondes (MAE). Contribution à l'évaluation des risques par l'estimation de sa bioaccessibilité. AgroParisTech; 2008.
100. Madrid F, Biasioli M, Ajmone-Marsan F. Availability and bioaccessibility of metals in fine particles of some urban soils. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2008 juill;55(1):21–32.
101. US EPA. Proceedings: ISEA bioavailability symposium, Durham, North California. Use of in vitro bioaccessibility/relative bioavailability estimates for metals in regulatory settings: what is needed? 2007 oct;
102. Brock T, Stopford W. Bioaccessibility of metals in human health risk assessment: evaluating risk from exposure to cobalt compounds. *J Environ Monit.* 2003 août;5(4):71N-76N.
103. Bosso ST, Enzweiler J, Angélica RS. Lead Bioaccessibility in Soil and Mine Wastes After Immobilization with Phosphate. *Water Air Soil Pollut.* 2008 juin;195(1-4):257–73.

**ANNEXE 1 : Fond documentaire**

**ANNEXE 2 : Descriptions des protocoles des essais de bioaccessibilité avec analogues gastro-intestinaux**

**ANNEXE 3 : Variabilité de certaines caractéristiques de 5 procédures issues de l'essai PBET (exemple)**

**ANNEXE 4 : Principaux résultats de bioaccessibilité des molécules inorganiques dans les sols**

**ANNEXE 5 : Principaux résultats de bioaccessibilité des molécules organiques dans les sols**

**ANNEXE 6 : Paramètres influençant les résultats des tests de bioaccessibilité**

**ANNEXE 7 : Différentes méthodes d'intégration de la bioaccessibilité/biodisponibilité dans les évaluations de risques sanitaires**