

## Validation d'un test de mesure de la bioaccessibilité du plomb dans les sols pollués

Julien Caboche, Sébastien Denys, Karine Tack, Catherine Jondreville, Guido Rychen, Cyril Feidt

► **To cite this version:**

Julien Caboche, Sébastien Denys, Karine Tack, Catherine Jondreville, Guido Rychen, et al.. Validation d'un test de mesure de la bioaccessibilité du plomb dans les sols pollués. 2. Rencontres nationales de la recherche sur les sites et sols pollués, Oct 2009, Paris, France. pp.NC. ineris-00973372

**HAL Id: ineris-00973372**

**<https://hal-ineris.archives-ouvertes.fr/ineris-00973372>**

Submitted on 4 Apr 2014

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

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

# Validation d'un test de mesure de la bioaccessibilité du plomb dans les sols pollués

**Julien Caboche<sup>1,2</sup>, Sébastien Denys<sup>2</sup>, Karine Tack<sup>2</sup>, Catherine Jondreville<sup>1</sup>, Guido Rychen<sup>1</sup>, Cyril Feidt<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup> INERIS, Direction des risques chroniques - 60550 Verneuil-en-Halatte – [julien.caboche@ineris.fr](mailto:julien.caboche@ineris.fr)

<sup>2</sup> URAFPA, Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux, Nancy-Université  
INRA, 2 avenue Forêt de Haye B.P. 172 F- 54505 Vandœuvre-lès-Nancy.

## **Résumé**

Les activités industrielles ont généré, une accumulation des éléments traces métalliques dans les sols qui, pour certains d'entre eux, sont toxiques pour les organismes biologiques et l'Homme. La gestion des sites et sols pollués repose sur l'évaluation des expositions à ces éléments. Le retour d'expérience montre que les voies d'exposition directe et notamment l'ingestion de terre pour les enfants engendrent les niveaux de risque les plus élevés. Toutefois, la pratique courante du calcul d'exposition et du risque se fonde sur la concentration totale d'un polluant dans un sol. Il a cependant été démontré que seule la fraction biodisponible de ce contaminant est susceptible d'induire un effet toxique. Cette fraction correspond à la dose de contaminant ingérée qui traverse l'épithélium intestinal et peut être distribuée aux tissus et organes cibles (Kelley et al., 2002). Ainsi la pratique actuelle tend à surestimer la dose à laquelle les cibles sont exposées. Divers protocoles *in vitro* permettant d'évaluer la biodisponibilité ont été développés ces dernières années. Ces derniers proposent une estimation de la fraction de contaminant extraite par les fluides digestifs (fraction bioaccessible). Au vu des nombreux protocoles publiés, le groupe BARGE (Bioaccessibility Research Group Europe) fédération d'instituts et de laboratoires impliqués en évaluation de risque a proposé un protocole unique (Cave et al., 2006). Toutefois, en vue d'une application large et en routine de ce protocole, il est nécessaire de s'assurer de différents paramètres :

- la pertinence des phénomènes simulés par rapport à la physiologie digestive humaine et de la mesure proposée par un tel protocole ;
- la répétabilité du protocole ;
- la mise à disposition des données aux évaluateurs de risque et le mode d'intégration de telles données en évaluation de risque ;

Ce travail s'intéresse au premier point mentionné ci-dessus. Une validation du protocole développé par le groupe BARGE (Bioaccessibility Research Group Europe) est proposée par la mesure et la corrélation de la bioaccessibilité et la biodisponibilité du plomb contenu dans des sols aux propriétés physico-chimiques variés et contaminés par deux types d'activité anthropique : minière et fonderie.

## **1. Matériels et Méthodes**

15 sols en provenance de trois sites ont été échantillonnés. Sur deux sites, des apports anthropiques de plomb, liés à des activités d'extraction et de traitement de minerais, se superposaient à une anomalie géochimique. Sur ces sites, les concentrations totales en plomb variaient de 4482 mg.kg<sup>-1</sup> à 40124 mg.kg<sup>-1</sup>. Les sols du troisième site ont été contaminés par des dépôts de particules en provenance d'une fonderie. Sur ce site, les concentrations de plomb variaient entre 1462 mg.kg<sup>-1</sup> à 30155 mg.kg<sup>-1</sup>. Pour chaque site, les sols ont été échantillonnés dans des zones représentatives de divers usages résidentiels : aires de jeux pour enfants, jardins potagers. En outre, des matériaux très concentrés correspondant à des déchets de traitement et déposés en superficie de sentiers de promenade ont également été échantillonnés. Pour chaque sol, un échantillon représentatif a été obtenu par combinaison de trois points prélevés à la superficie du sol (profondeur d'échantillonnage 0-5 cm). La biodisponibilité du plomb dans les sols a été évaluée sur des porcelets dont les caractéristiques du système digestif sont proches de celui de l'Homme. Pour chaque sol, trois doses de plomb ont été administrées aux porcelets, à jeun, quotidiennement, pendant 14 jours. Les doses

administrées variaient entre 70 à 8000  $\mu\text{gPb/kgPV/jour}$ . Pour chaque modalité, trois porcelets ont été utilisés. Ensuite, les porcelets ont été sacrifiés et les concentrations de plomb dans les urines, les reins, le foie et l'os ont été mesurées par ICP-MS. En parallèle et selon le même protocole, la biodisponibilité du plomb issue d'une forme de référence (totalement soluble), l'acétate de plomb, a également été déterminée pour une gamme de concentration de 50 à 4000  $\mu\text{gPb/kgPV/jour}$ . Finalement, la biodisponibilité relative du plomb, pour chaque sol, est mesurée comme étant le ratio des pentes des courbes dose-réponse obtenues, pour un sol donné et la forme de référence au sein du même compartiment. La bioaccessibilité relative du plomb dans les 15 sols a été déterminée en utilisant le protocole unifié BARGE. Ce test consiste en une extraction séquentielle utilisant des solutions digestives synthétiques et simulant les processus physiques et chimiques se déroulant dans la bouche, l'estomac et l'intestin grêle. Le test BARGE unifié permet ainsi d'estimer une bioaccessibilité gastrique et gastro-intestinale. Les mesures de bioaccessibilité ont été réalisées en utilisant 5 réplicats. Pour valider l'hypothèse que la bioaccessibilité relative peut estimer la biodisponibilité relative une corrélation linéaire a été tracée ; et la pente obtenue devant être non significativement différente de 1, et l'ordonnée à l'origine non significativement différente de 0.

## 2. Résultats et discussions

Les résultats montrent que les quatre compartiments cibles employés dans cette étude peuvent être utilisés pour estimer la biodisponibilité relative du plomb, pour chaque sol contaminé. En effet, la biodisponibilité relative du plomb, pour l'ensemble des sols au sein des quatre compartiments cibles, varie seulement de 0,7% à 7%. Ainsi, en moyennant les valeurs obtenues dans chaque compartiment, la biodisponibilité relative du plomb varie de 6% à 78%. Les mesures de bioaccessibilité varient de 10% à 82% pour la phase gastrique et de 9% à 90% pour la phase gastro-intestinale. Les comparaisons entre les données in vivo et in vitro, ont démontré que la biodisponibilité relative et la bioaccessibilité relative dans les deux phases du test étaient linéairement corrélées. Les modèles linéaires suivants ont été obtenus pour chacune des phases :

Phase gastrique : Biodisponibilité relative (%) =  $0,9 \times \text{Bioaccessibilité relative (\%)} - 2,5$  ( $R^2=0,92$ )

Phase gastro-intestinale : Biodisponibilité relative (%) =  $0,8 \times \text{Bioaccessibilité relative (\%)} - 7,4$  ( $R^2=0,84$ )

Les résultats montrent que les corrélations obtenues sont très satisfaisantes. Cependant, en dépit de la corrélation obtenue pour la phase gastro-intestinale et du fait que le plomb est particulièrement absorbé au sein de l'intestin grêle, la bioaccessibilité gastro-intestinale a tendance à moins bien différencier les sols entre eux comparativement à la bioaccessibilité gastrique et donc à moins bien estimer la biodisponibilité relative du plomb dans les sols.

## 3. Conclusions

Cette expérience démontre que la biodisponibilité du plomb dans les sols peut être inférieure, voire même très nettement inférieure, à la concentration totale du polluant dans le sol. Ceci met en évidence la nécessité d'aller au-delà de la simple mesure de la concentration totale d'un élément dans les sols afin d'en appréhender sa toxicité. D'où l'importance d'avoir une méthode validée, rapide et facile pour estimer la biodisponibilité des polluants dans les sols. Ainsi, les résultats de l'étude mettent en lumière que la phase gastrique du test in vitro BARGE unifié peut fournir une alternative possible aux investigations in vivo afin de déterminer la biodisponibilité relative du plomb dans l'optique d'améliorer l'évaluation des risques.

## 1. CONTEXTE

Les activités industrielles ont généré, une accumulation des éléments traces métalliques dans les sols qui, pour certains d'entre eux, sont toxiques pour les organismes biologiques et l'Homme. La gestion des sites et sols pollués repose sur l'évaluation des expositions à ces éléments. Le retour d'expérience montre que les voies d'exposition directe et notamment l'ingestion de terre pour les enfants engendrent les niveaux de risque les plus élevés (Paustenbach, 2000). Toutefois, la pratique courante du calcul d'exposition et du risque se fonde sur la concentration totale d'un polluant dans un sol. Il a cependant été démontré que seule la fraction biodisponible de ce contaminant est susceptible d'induire un effet toxique (Dieter *et al.*, 1993 ; Casteel *et al.*, 2006). Cette fraction correspond à la dose de contaminant ingérée qui traverse l'épithélium intestinal et peut être distribuée aux tissus et organes cibles (Kelley *et al.*, 2002). Ainsi la pratique actuelle tend à surestimer la dose à laquelle les cibles sont exposées. De nombreux protocoles *in vitro* permettant d'évaluer de façon simplifiée la biodisponibilité ont été développés ces dernières années. Ces derniers proposent une estimation de la fraction de contaminant extraite par les fluides digestifs (fraction bioaccessible) et repose sur le postulat que la fraction bioaccessible d'un contaminant est l'étape limitante dans le processus de biodisponibilité. Au vu des nombreux protocoles publiés, le groupe BARGE (Bioaccessibility Research Group Europe) fédération d'instituts et de laboratoires impliqués en évaluation de risque a proposé un protocole unique (Cave *et al.*, 2006). Toutefois, en vue d'une application large et en routine de ce protocole, il est nécessaire de s'assurer de différents paramètres :

- la pertinence des phénomènes simulés par rapport à la physiologie digestive humaine et de la mesure proposée par un tel protocole ;
- la répétabilité du protocole ;
- la mise à disposition des données aux évaluateurs de risque et le mode d'intégration de telles données en évaluation de risque ;

Ce travail s'intéresse au premier point mentionné ci-dessus. Une validation du protocole UBM (Unified BARGE Method) développé par le groupe BARGE est proposée par la mesure et la corrélation de la bioaccessibilité et la biodisponibilité du plomb contenu dans des sols aux propriétés physico-chimiques variés et contaminés par deux types d'activité anthropique : minière et fonderie.

## 2. MATERIELS ET METHODES

### 2.1) Les sols

Les sites utilisés ont été sélectionnés dans l'optique d'avoir des historiques de contamination différents et des sols aux propriétés physico-chimiques contrastées. 15 sols en provenance de trois sites ont été échantillonnés. Sur deux sites, des apports anthropiques de plomb, liés à des activités d'extraction et de traitement de minerais, se superposaient à une anomalie géochimique. Sur ces sites, les concentrations totales en plomb variaient de 4482 mg.kg<sup>-1</sup> à 40124 mg.kg<sup>-1</sup>. Les sols du troisième site ont été contaminés par des dépôts de particules en provenance d'une fonderie. Sur ce site, les concentrations de plomb variaient entre 1462 mg.kg<sup>-1</sup> à 30155 mg.kg<sup>-1</sup>. Pour chaque site, les sols ont été échantillonnés dans des zones représentatives de divers usages résidentiels : aires de jeux pour enfants, jardins potagers. En outre, des matériaux très concentrés correspondant à des déchets de traitement et déposés en superficie de sentiers de promenade ont également été échantillonnés. Pour chaque sol, un échantillon représentatif a été obtenu par combinaison de trois points prélevés à la superficie du sol (profondeur d'échantillonnage 0-5 cm). Après réception des échantillons au laboratoire chaque sol a été mis à sécher en couche mince pendant 72h à température ambiante, puis homogénéisé par brassage manuel. Chaque sol a ensuite été tamisé sur un tamis de maille inférieure à 2 mm puis broyé. Enfin, l'échantillon broyé est tamisé à 250 µm qui est considérée comme étant la fraction de sol adhérent aux mains des enfants (Paustenbach, 2000).

## **2.2) Estimation de la biodisponibilité relative**

La biodisponibilité du plomb dans les sols a été évaluée sur des porcelets dont les caractéristiques du système digestif sont proches de celui de l'Homme. Dans le cadre de l'étude, la biodisponibilité relative a été déterminée. L'objectif de la biodisponibilité relative est de comparer l'accumulation ou l'excrétion d'un contaminant ingéré via la matrice sol et via une forme de référence totalement soluble dans le tractus digestif.

Les porcelets ont été exposés pendant 14 jours à une dose unique de sol ou d'une forme de référence administrée quotidiennement à 9h, après une nuit à jeun, soit 12 heures après le dernier repas. Pour exposer les porcelets aux contaminants du sol ou à la forme de référence, la dose d'exposition est placée au centre d'une « boulette » de nourriture humidifiée (moins de 4 g) puis donnée à chaque porcelet directement à la main. Pour chaque sol, trois quantités d'ingestion ont été utilisées : 0,5, 1 et 2g de sol séché. Les doses administrées variaient entre 70 à 8000 µgPb/kgPV/jour en fonction de la concentration totale en plomb dans les sols. Pour la forme de référence, l'acétate de plomb, 5 doses d'exposition variant de 50 à 4000 µgPb/kgPV/jour ont été utilisées. Pour chaque modalité, trois porcelets ont été utilisés.

Ensuite, les porcelets ont été sacrifiés et les concentrations de plomb dans les urines, les reins, le foie et l'os ont été mesurées par ICP-MS.

Finalement, la biodisponibilité relative du plomb, pour chaque sol, est mesurée comme étant le ratio des pentes des courbes dose-réponse obtenues, pour un sol donné et la forme de référence au sein du même compartiment cible.

## **2.3) Estimation de la bioaccessibilité relative**

La bioaccessibilité relative du plomb dans les 15 sols a été déterminée en utilisant le protocole UBM développé par le groupe BARGE. Ce test consiste en une extraction séquentielle utilisant des solutions digestives synthétiques et simulant les processus physiques et chimiques se déroulant dans la bouche, l'estomac et l'intestin grêle. Les conditions de ce test sont détaillées sur la figure 1. Le test BARGE unifié permet ainsi d'estimer une bioaccessibilité gastrique et une gastro-intestinale. Les mesures de bioaccessibilité ont été réalisées en utilisant 5 réplicats.

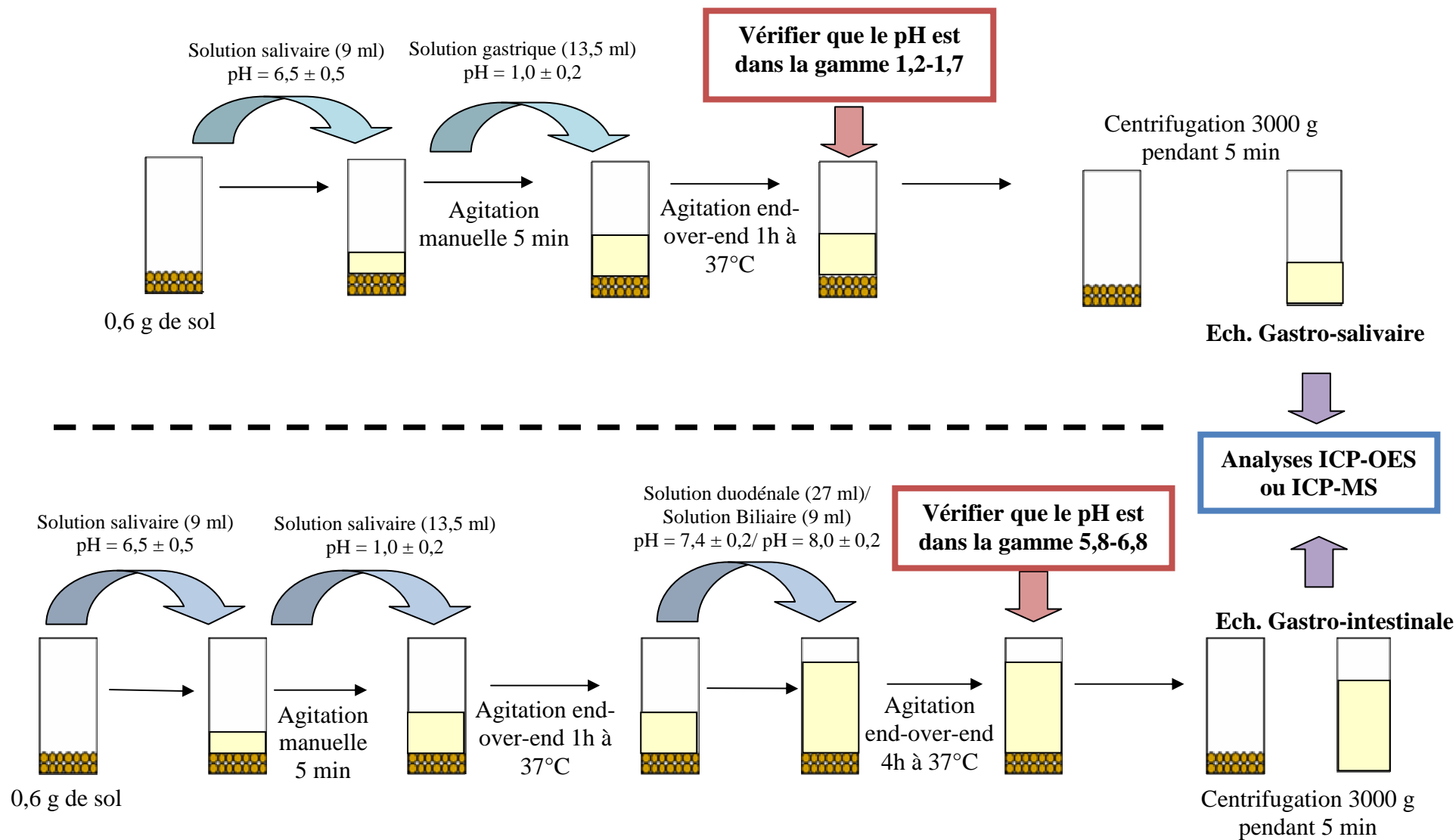


Figure 1 : Schéma récapitulatif du test *in vitro* unifié BARGE (UBM)

### 3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

Pour les 16 sols contaminés, les courbes doses-réponses du plomb dans chacun des compartiments ont pu être établies. La figure 2 présente un exemple de courbes dose-réponse obtenues pour différents sols et la forme de référence dans l'os. Premièrement, les résultats présentés sur cette figure montrent que les courbes dose-réponse sont significativement ajustées par un modèle linéaire. Ensuite, les résultats montrent que la courbe dose-réponse présentant la pente la plus importante est obtenue pour la forme de référence (l'acétate de plomb) alors que pour les sols des valeurs de pente significativement différentes sont obtenues.

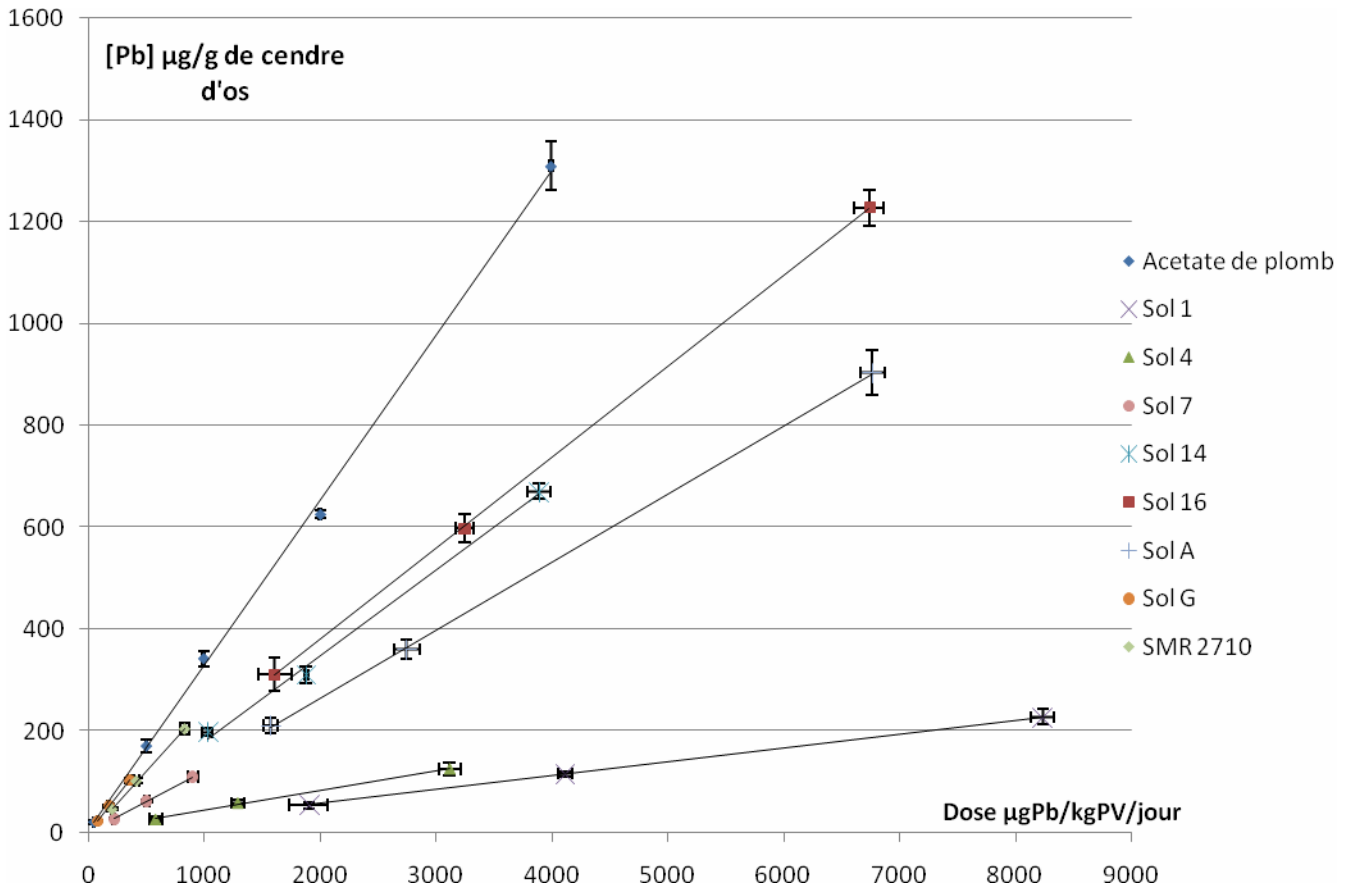


Figure 2 : Exemple de courbes dose-réponse obtenues pour différents sols et pour l'acétate de plomb dans l'os (moyenne  $\pm$  écart-type, n=3)

Les quatre compartiments cibles employés dans cette étude ont permis d'estimer la biodisponibilité relative du plomb pour chaque sol contaminé. De plus, les valeurs de biodisponibilité déterminées à partir de chaque compartiment cible ne sont pas significativement différentes les unes des autres. Ainsi, en moyennant les valeurs obtenues dans chaque compartiment, la biodisponibilité relative du plomb varie de 6% à 78%. Les mesures de bioaccessibilité du plomb varient de 10% à 82% pour la phase gastrique et de 9% à 90% pour la phase gastro-intestinale.

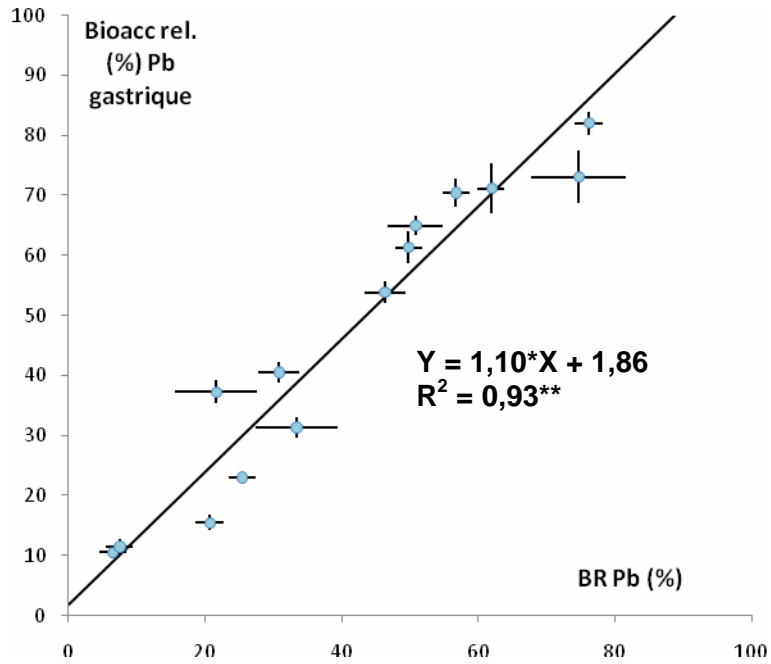


Figure 3 : Corrélation entre la bioaccessibilité gastrique relative (Bioacc rel (%)) déterminée par le test *in vitro* UBM et la biodisponibilité relative (BR (%)) pour le plomb. \*\* indique que  $r^2$  est hautement significatif ( $p < 0,01$ ).

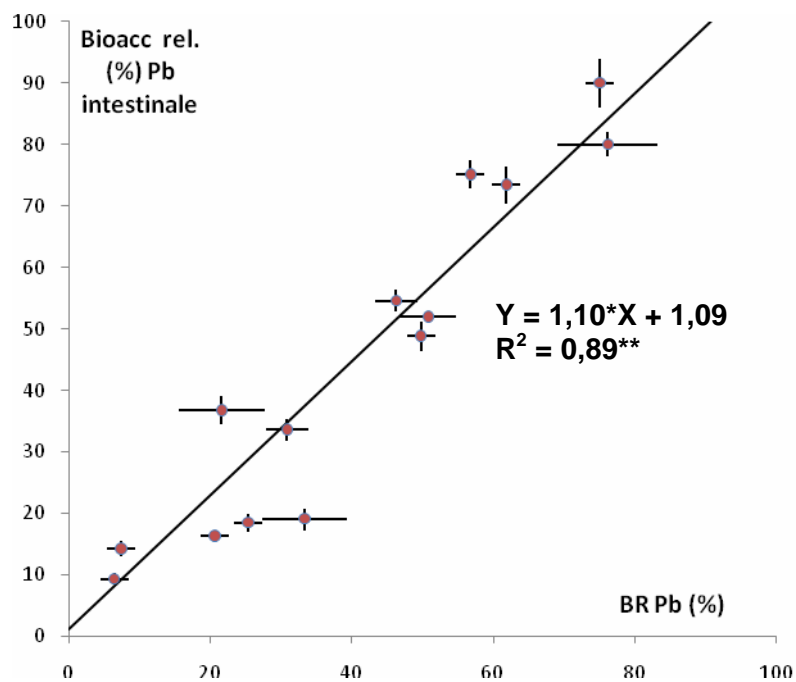


Figure 4 : Corrélation entre la bioaccessibilité intestinale relative (Bioacc rel (%)) déterminée par le test *in vitro* UBM et la biodisponibilité relative (BR (%)) pour le plomb. \*\* indique que  $r^2$  est hautement significatif ( $p < 0,01$ ).



Les figures 3 et 4 présentent les résultats des corrélations entre la biodisponibilité relative et la bioaccessibilité relative pour chacune des phases digestives du test UBM. Premièrement, les résultats montrent globalement qu'une corrélation hautement significative est obtenue à la fois pour la phase gastrique et la phase gastro-intestinale ( $r^2 = 0,93$  et  $0,89$  ;  $p < 0,01$ ). De plus, la sélection des sols utilisés pour l'étude, a permis d'obtenir une corrélation pour une gamme de valeurs très large et avec une très bonne répartition des valeurs sur toute la gamme. Ces critères permettent d'affirmer qu'une corrélation robuste est obtenue entre bioaccessibilité relative et biodisponibilité relative.

Ensuite, les résultats montrent que les modèles de prédiction obtenus pour les deux phases digestives sont quasiment identiques. De plus, les pentes des modèles de prédiction ne sont pas significativement différentes de 1 ( $p > 0,05$ ) et les ordonnées à l'origine ne sont pas significativement différentes de 0 ( $p > 0,05$ ). Ainsi, en se basant sur ces résultats, les corrélations obtenues permettent de valider le postulat de base des tests *in vitro*, c'est-à-dire que la bioaccessibilité est le facteur limitant de la biodisponibilité.

En s'appuyant sur ces différents critères d'acceptabilité, l'étude démontre que le test UBM développé par le groupe BARGE est validé par des données *in vivo* et donc que les variations de biodisponibilité du plomb dans les sols peuvent être estimées par la notion de bioaccessibilité.

#### 4. CONCLUSIONS

Cette expérience démontre que la biodisponibilité du plomb peut être très variable d'un sol à un autre. Ceci met en évidence la nécessité d'aller au-delà de la simple mesure de la concentration totale d'un élément dans les sols afin d'en appréhender sa toxicité. D'où l'importance d'avoir une méthode validée, rapide et facile pour estimer la biodisponibilité des polluants dans les sols. Ainsi, les résultats de l'étude mettent en lumière que les phases gastrique et gastro-intestinale du test *in vitro* UBM peuvent fournir une alternative possible aux investigations *in vivo* afin de déterminer la biodisponibilité relative du plomb dans l'optique d'améliorer l'évaluation des risques.

#### 5. REFERENCES

- Casteel SW, Weis CP, Henningsen GM, et al. Estimation of Relative Bioavailability of Lead in Soil and Soil Like Materials Using Young Swine. *Environmental Health Perspectives*, 2006, 114, 1162–71 doi:10.1289/ehp.8852 available at <http://dx.doi.org/> [Online 4 April 2006].
- Cave, M., Wragg, J., Klinck, B., Grön, C., Oomen, A.G., Ollson, C., Koch, I., Reimer, K., Basta, N., Tack, K and Casteel, S. Preliminary assessment of a unified bioaccessibility method for Arsenic in soils. *International conference in Epidemiology and Environmental Exposure*. Paris, 2-6 september 2006.
- Dieter M.P., Matthews H.B., Jeffcoat R.A., Moseman R.F. Comparison of lead bioavailability in F344 rats fed lead acetate, lead oxide, lead sulfide, or lead ore concentrate from Skagway, Alaska. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 1993, 39, 79–93
- Kelley, M.E., Brauning, S.E., Schoof, R.A., Ruby, M.V. Assessing oral bioavailability of metals in soil. Batelle Press, 2002, PP.124.
- Pautenbach, D.J. The practice of exposure assessment: A state of the art review (Reprinted from Principles and methods of toxicology, ath edition, 2001). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Review*, 2000, 3, 179-291.

**Remerciements** : Les auteurs souhaitent remercier les équipes de l'URAFPA et de l'INERIS pour leurs implications dans le bon déroulement de l'étude et également l'ADEME qui finance le projet.