



THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

réalisée au sein de **JUNIA**

École doctorale n°104 : Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement– ED SMRE

Laboratoire de Génie Civil et géo-Environnement – LGCgE ULR4515

Amélioration des évaluations de risques sanitaires par l'utilisation de la bioaccessibilité orale comme outil de caractérisation des expositions de l'Homme aux éléments métalliques

Thèse soutenue publiquement le 04/11/2024, par

Madeleine BILLMANN

pour obtenir le grade de DOCTEURE en Biologie de l'environnement, des organismes, des populations, écologie de L'UNIVERSITE DE LILLE

Devant le jury composé de :

DERAM Annabelle, Professeure des universités Université de Lille, LGCqE **DUMAT Camille**, Professeure des universités Université de Toulouse, INP-ENSAT DENYS Sébastien, Docteur, HDR Santé Publique France JOUSSEIN Emmanuel, Professeur des universités Université de Limoges, E2Lim BRAVIN Matthieu, Maître de conférences Cirad, Montpellier PELFRENE Aurélie, Maîtresse de conférences, HDR Junia, LGCgE HULOT Corinne, Docteure Ineris PAUGET Benjamin, Docteur Tesora MAROT Franck, Docteur Ademe

Présidente

Rapporteure

Rapporteur

Examinateur

Examinateur

Directrice de thèse

Co-encadrante de thèse

Co- encadrant de thèse

Membre invité









Laboratoire de Génie Civil et géo-Environnement

Remerciements

Ce manuscrit marque l'aboutissement de trois années dont je sors enrichie. La thèse est une période stimulante, remplie de réflexions, d'apprentissages, de doutes et de rencontres. Cette aventure n'aurait pas été la même sans le soutien, les encouragements et les conseils de nombreuses personnes, que je tiens à remercier ici.

J'adresse des premiers remerciements à l'Ademe, Junia, l'Ineris et Tesora pour les financements dont ce travail à pu bénéficier.

Je tiens ensuite à exprimer ma reconnaissance à ma directrice de thèse, Aurélie Pelfrêne. Son expertise, ses conseils, sa disponibilité, et nos nombreux échanges ont été essentiels tout au long de ce travail. Merci de m'avoir guidée avec rigueur et bienveillance, et d'avoir su m'encourager quand il le fallait.

Je souhaite également remercier mes encadrants de thèse, Corinne Hulot et Benjamin Pauget. Leur soutien, leur bienveillance, ainsi que leurs précieux retours lors de nos échanges m'ont beaucoup apporté. Un merci à Arnaud Papin pour son aide, ainsi qu'à Franck Marot de l'Ademe pour son soutien et le suivi régulier du bon déroulement de ma thèse.

Mes remerciements s'adressent à Camille Dumat, Professeure à l'Université de Toulouse, et à Sébastien Denys, Directeur de la Direction Santé Environnement Travail à Santé Publique France, d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Je remercie Annabelle Deram, Professeure à l'Université de Lille, Matthieu Bravin, Maître de Conférences au Cirad de Montpellier, Emmanuel Joussein, Professeur à l'Université de Limoges, pour avoir accepté de participer à mon jury. Je suis honorée de leur présenter mon travail. Je remercie également Marilyne Soubrand, Professeure à l'Université de Limoges, Julien Caboche, Directeur d'agence à TAUW, et Jérôme Petit, Chargé de projets à la Cellule Environnement et Santé de l'ISSeP, pour avoir suivi et soutenu la progression de mon travail lors des comités de suivi de thèse.

Je remercie Matthieu Delannoy, Stephan Jurjanz et Ronagul Turganova du laboratoire L2A de l'Université de Lorraine pour la réalisation des essais *in vivo*. Dans le cadre de l'étude pilote sur les sites d'Ile-de-France, je remercie Ronald Charvet de la Ville de Paris pour l'accès aux sites ainsi Catherine Chaabane, Florence Lei et Cathy Lebrun du Laboratoire d'Agronomie de la Ville de Paris pour la réalisation des analyses des solutions. Je remercie également Marilyne Soubrand et Emmanuel Joussein du laboratoire E2Lim pour la réalisation des analyses DRX dans ce travail.

Mes pensées se tournent également vers mes collègues qui ont partagé mon quotidien au cours de ces trois années. Je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude à Christophe Waterlot pour son aide et sa bienveillance. Un grand merci à toute l'équipe de chercheurs : Géraldine, Brice, Aritz, Julien, Sébastien, Agathe, Julie, Junias, pour nos échanges. Merci à Karin pour sa précieuse aide lors des analyses statistiques, ainsi qu'à Élise pour son travail. Je remercie également Aurélien, Julien, David, et Arnaud pour leur aide au laboratoire.

Un grand merci à Farid et Yohann pour leur accueil et leur aide lors de mes déplacements à l'Ineris, et désolée pour tous ces marathons de la minéralisation. Merci également à Ulrick pour son aide sur le terrain à Paris, et à toute l'équipe de Tesora pour leur accueil chaleureux lors de mes passages.

Je souhaite également remercier toutes les personnes avec qui j'ai partagé de bons moments à l'ISA. Une pensée aux doctorants, anciens et actuels, notamment Pénélope, Ashley, et Félix, ainsi que pour Laure et tous les stagiaires qui sont passés par le laboratoire, en particulier Line et Zoé, avec qui je partage le bureau en cette fin de thèse. Merci à Marine et Florian pour l'aventure MT180. Un grand merci aussi à l'équipe PDD, qui a évolué au fil du temps : Julien, Pénélope, Ashley, Aurélien, Augustin, Laure, Louis, et le service informatique. Je n'ai qu'une seule chose à dire : Le PPD, tu sais quand tu arrives, mais jamais quand tu repars. Merci à Julien, Guillaume, et Picole pour les cacahuètes et la gourdasse.

Je pense également à toutes les personnes que j'ai rencontrées à Lille, et qui ont rendu cette période de ma vie particulièrement agréable. Merci à mes colocataires actuelles, Sabrina et Sarah, ainsi qu'à mes anciennes colocataires, Marie et Claire, pour tous ces bons moments, leur soutien, et nos longues discussions à refaire le monde sur le canapé. Merci aussi à Nathan, Astrid, Louis, Maxime, Robin, Charles, Loïc, Sarah, et Léa pour toutes ces soirées passées à l'Autrement Dit, au Braz, ou à Saint-So. Une pensée pour Sarah, Jeanne, et les copains de Paris, merci de m'avoir supportée durant mes 1001 répétitions pour MT180, et pour ces week-ends qui m'ont permis de me changer les idées.

Je souhaite également exprimer toute ma gratitude à ma marraine Barbara, ainsi qu'à Avril, Andréa, Cédric, Henri, et Galinette, pour leur soutien, leur accueil, et tous ces bons moments partagés durant ces trois années.

Je tiens évidemment à remercier mes parents et mes frères pour avoir toujours été là quand il le fallait ainsi que leur accueil à Hunspach quand j'avais besoin d'échapper à la ville. Et merci à mes meilleures amies, Fanny, Chloé, Gwendoline, et Charlène sur qui je peux toujours compter.

Enfin, je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à cette thèse, que ce soit par leur soutien moral, leurs conseils ou simplement par leur présence.

Liste des abréviations

- ABA : Biodisponibilité absolue af / fa : Facteur d'absorption BAc : Bioaccessibilité CAB: California Arsenic Bioaccessibility DIN : Deutsches Institut für Normung DJE / ADI : Dose journalière d'exposition DOC : Dissolved organic carbon EM : Element métallique ERI / CR : Excès de risque individuel ERS : Evaluation des risques sanitaires G : Gastrique GI: Gastro-intestinale HHRA : Human health risk assessment IEM : Interprétation de l'Etat des milieux IVG : In vitro Gastrointestinal test IVIV : In vitro/in vivo MO / OM : Matière organique **PBET : Physiologically Based Extraction Test** PG : Plan de Gestion **PTE : Potentially Toxic Element** QD / HQ : Qutient de danger **RBA** : Biodisponibilité relative **RBAc** : Bioaccessibilité relative RIVM : Dutch National Institute for Public Health and the Environment SBET : Simple Bioaccessibility Extraction Test SBRC : Solubility/Bioavailability Research Consortium SSP : Sites et sols pollués STEP : Station d'épuration des eaux usées
- UBM : Unified BARGE Method
- VTR / TRV : Valeur toxicologique de référence

Table des matières

Introduction générale	1
Chapitre 1 : La bioaccessibilité orale des éléments métalliq	ues dans les sols 5
1.1. Etat des connaissances	6
1.1.1. Introduction	7
1.1.1. Common in vitro extraction procedures for predicting	bioaccessibility of PTEs10
1.1.2. Ranges of PTEs bioaccessibility data in soils	
1.1.3. Factors influencing oral bioaccessibility of PTEs	
1.1.3.1. Influence of the source of PTEs in soils	
1.1.3.2. Influence of soil properties	
Soil pH	
Soil organic matter	
Mineral constituents	
Solid phase distribution and chemical form	
Statistical modeling of bioaccessibility	
1.1.4. Use of bioaccessibility in human health risk assessmen	t35
1.1.5. Knowledge gaps, points for attention and future persp	ectives 40
1.1.6. Conclusions	
1.1.7. References	
1.1.2. Bilan de l'état de l'art	57
1.2. Utilisation de la bioaccessibilité orale des EM en France	
1.3. Bilan et objectifs de la thèse	
Chapitre 2 : Matériels et méthodes	63
2.1. Sélection des sols	64
2.1.1. Collecte des échantillons du Lot 1	64
2.1.2. Collecte des échantillons du Lot 2	
2.1.3. Préparation des échantillons de sols	
2.2. Caractérisation physique et chimique des sols	
2.2.1. Concentrations totales en EM	
2.2.2. Paramètres physico-chimiques des sols	
2.2.3. Distribution des EM dans les phases porteuses	
2.2.4. Spéciation chimique du Cr III/VI	
2.3. Mesure de la biodisponibilité orale	
2.3.1. Critères de validation in vivo/in vitro	

2.3.2. Calcul de la biodisponibilité relative	72
2.3.3. Les formes de référence	73
2.3.4. Démarche expérimentale	73
2.3.4.1. Evaluation de la relation dose-réponse	73
2.3.4.2. Exposition des porcelets aux sols sélectionnés	74
2.3.4.3. Analyses des matrices biologiques	75
2.4. Mesure de la bioaccessibilité orale des EM dans les sols	77
2.4.1. Test UBM	77
2.4.2. Test simplifié à l'HCl pour la prédiction de la bioaccessibilité	
2.5. Mise en place d'une expérimentation de vieillissement accéléré des sols avec ou d'amendements (compost, biochar)	sans apport
2.6. Traitement statistique	81
e Ni dans des sols multi-contaminés Partie 1 : Intérêt de mesurer la bioaccessibilité du chrome et du nickel dans les	83 s sols multi-
ontaminés lors de l'évaluation des expositions et des risques sanitaires	85
3.1. Etude de la bioaccessibilité du Cr et du Ni et des autres EM	85
3.1.1. Introduction	87
3.1.2. Materials and methods	88
3.1.2.1. Soil sample collection and characterization of soil parameters	88
3.1.2.2. Chemical extraction methods	89
Sequential chemical extraction	89
In vitro oral BAc measurements of Cr and Ni	90
3.1.2.3. Chemical speciation of Cr	
3.1.2.4. Statistical analysis	
3.1.3. Results and discussion	
3.1.3.1. Physicochemical properties of the soil	
3.1.3.2. Cr and Ni solid-phase distribution in the soils studied	92
3.1.3.1. Cr and Ni in vitro oral bioaccessibility	
Chromium	97
Nickel	
Comparison of Cr and Ni	101
	101 103
3.1.3.4. Evaluation of the ability of the single-extraction method with HCl to pred	101 103 dict the BAc of
3.1.3.4. Evaluation of the ability of the single-extraction method with HCl to pred Cr and Ni	
3.1.3.4. Evaluation of the ability of the single-extraction method with HCl to pred Cr and Ni	

3.1.2. Résultats de la bioaccessibilité sur les autres EM : As, Cd, Pb et Sb	113
3.2.1. Degré de contamination des 34 sols de l'étude	114
3.1.2.2. Distribution des EM dans les phases porteuses du sol	114
3.1.2.3. La bioaccessibilité orale	116
3.1.2.4. Prédiction de la bioaccessibilité au moyen du test simplifié HCl	118
3.1.3. Bilan	120

121

Partie 2 : Etude de l'aspect temporel avec et sans apport d'amendements sur des sols multi-contaminés

3.2. Influence du vieillissement avec ou sans apport d'amendements sur la bioaccessibilité du du Ni dans des sols multi-contaminés	ı Cr et 121
3.2.1. Introduction	123
3.2.2. Methodology	125
3.2.2.1. Experimental set-up	125
3.2.2.1. Analysis	126
Pseudototal concentrations and pH values	126
Solid phase distribution	127
In vitro BAc of Cr, Ni and other PTEs	127
Chemical speciation of Cr	128
Mineralogy	128
3.2.2.3. Statistical analysis	128
3.2.3. Results and discussion	128
3.2.3.1. Influence of soil aging with or without amendments on soil pH	128
3.2.3.1. Influence of soil aging with or without amendments on BAc of PTEs	130
Nickel	130
Chromium	131
3.2.3.3. Other PTEs	134
3.2.3.4. Relationships between oral BAc, mineralogical phases and solid phase distributic	on 135
Mineralogical characterization	136
Geochemical behavior of PTEs	138
Relationships with BAc of PTEs	140
3.2.4. Conclusion	142
3.2.5. References	143
3.2.6. Bilan	147
Partie 3 : Etude de la validation du modèle in vitro UBM pour le chrome et le nickel	149
3.3. Etude de la biodisponibilité du Cr et du Ni	149
3.3.1. Evaluation de la relation dose-réponse des formes de référence	149

3.3.1.1. Formes de référence, doses d'exposition et organes analysés	149
Sulfate de Nickel (II) hexahydraté	150
Dichromate de sodium dihydraté (Cr VI)	151
Acétate de chrome (Cr III – forme soluble)	153
Picolinate de chrome (Cr III – forme insoluble)	154
3.3.1.2. Bilan sur la proposition des organes et des doses d'exposition	155
3.3.2. Première estimation de la biodisponibilité relative (RBA) du Cr et du Ni dans les so comparaison à la bioaccessibilité relative (RBAc)	ls et 156
3.3.3. Bilan	159
Chapitre 4 : Etude de la mise en œuvre de la bioaccessibilité orale des éléments métalliques dans la gestion des sites et sols pollués	161
Partie 1 : Intégration de la bioaccessibilité orale d'As, Cd et Pb dans les évaluations quantitatives des risques sanitaires	163
4.1.1. Influence du mode de préparation des sols sur la bioaccessibilité orale des EM	163
4.1.2. Modalités de prise en compte de la bioaccessibilité dans les calculs des risques	165
4.1.2.1. Généralités sur les calculs des expositions et des risques	165
4.1.2.1. Ajustement de la DJE par la bioaccessibilité : méthode InVS-Ineris (2012)	170
Cas de l'arsenic et du cadmium	170
Cas du plomb	171
Recommandation sur le choix de la phase	171
4.1.2.3. Nouvelle proposition d'intégration de la bioaccessibilité pour les éléments c (As, Cd, Pb)	J'intérêt 174
4.1.3. Bilan	175
Partie 2 : Etude de la bioaccessibilité du Pb sur un territoire pilote d'Ile-de-France	177
4.2.1. Introduction	179
4.2.2. Materials and methods	181
4.2.2.1. Sampling sites	181
4.2.2.2. Soil preparation protocols	182
4.2.2.3. Soil characterization	183
4.2.2.4. In vitro oral BAc measurement	183
4.2.2.5. Human health risk assessment	184
4.2.2.6. Statistical analysis	186
4.2.3. Results and discussion	186
4.2.3.1. Soil properties	186
4.2.3.2. Assessment of Pb BAc by the simplified method as a screening tool	188

4.2.3.3. Influence of physico-chemical properties of soils on BAc	189
4.2.3.4. Influence of soil sample preparation on oral BAc of Pb	190
4.2.3.4. Application of RBA in human health risk assessment	192
4.2.4. Conclusion	196
4.2.5. References	197
4.2.6. Bilan	200

Chapitre 5 : Discussion générale, conclusions et perspectives

Quelle est la plus-value de l'utilisation de la bioaccessibilité des EM (As, Cd, Cr, Ni, Pb et Sb) pou	ır
évaluer l'exposition des populations en comparaison des concentrations totales ? Quels sont les	5
facteurs d'influence de la bioaccessibilité ?	. 203
Le test UBM peut-il être étendu et validé IVIV à d'autres EM ?	. 208
Comment prendre en compte la bioaccessibilité orale des EM dans les calculs de risques ?	. 212

Références

217

223

203

Annexes

SM1 : Annexe de l'article "Population exposure to chromium and nickel in soils of geogenic and/or anthropogenic origin: Importance of oral bioaccessibility"	3
SM2 : Annexe de l'article "Influence of soil aging on oral bioaccessibility of Cr, Ni and other PTEs in multicontaminated soils with or without changes in practices"	5 .6
SM3 : Annexe de l'article "Human health risk assessment of lead exposure from soil ingestion ir	۱

Liste des Figures

Figure 1. Schématisation du devenir des contaminants dans le système digestif : notions de
biodisponibilité et bioaccessibilité orale 3
Figure 2. Bioaccessibility ranges of As, Cd, Cr, Ni, Pb, and Sb in gastric (G) and gastrointestinal (GI)
phases according to their frequency of occurrence in the literature
Figure 3. Schéma de synthèse des méthodes mises en œuvre61
Figure 4. Démarche expérimentale proposée pour répondre aux objectifs de la thèse
Figure 5. Démarche des essais in vivo, mode de préparation des matrices biologique et implication des
doctorantes (adapté de Caboche, 2009)76
Figure 6. Schéma du protocole du test UBM (NF ISO 17924)77
Figure 7. Schéma du protocole du test simplifié HCl pour la prédiction de la bioaccessibilité
Figure 8. Expérimentation de vieillissement accéléré, avec ou sans apport d'amendements (compost,
biochar (adapté de Nguyen, 2019) ; T : témoin ; C : compost ; B : biochar
Figure 9. Schéma des méthodes mises en œuvre dans le Chapitre 3
Figure 10. a, b Fractionation of Cr and Ni (expressed in% of pseudototal concentration) in comparison
to the pseudototal concentrations (expressed in mg kg ⁻¹) in the 27 soils
Figure 11. Bioaccessible fractions of Cr and Ni (mean and standard deviation values expressed in % of
pseudototal concentrations; n = 3) in the gastric (G) and gastrointestinal (GI) phases in comparison to
the pseudototal concentrations (expressed in mg kg ⁻¹)
Figure 12. Extractable concentrations of Cr and Ni by HCl (expressed in mg kg ⁻¹ and%) in comparison
with the pseudototal concentrations (expressed in mg kg ⁻¹)
Figure 13. Relationships between extractable concentrations of Cr and Ni by the UBM in the gastric
(G) and gastrointestinal (GI) phases and those by HCl. All extracted concentrations are expressed in
mg kg ⁻¹
Figure 14. Distribution de l'As, du Cd, du Pb et du Sb dans les phases porteuses des sols mesurée par
extraction séquentielle BCR (exprimé en% de la concentration totale) et concentrations totales
(exprimées en mg kg ⁻¹)
Figure 15. Bioaccessibilité de l'As, du Cd, du Pb et de Sb mesurée par le test UBM dans les phases
gastrique (G) et gastro-intestinale (GI) (exprimé en% de la concentration totale) par rapport aux
concentrations totales (exprimées en mg kg ⁻¹)
Figure 16. Relation entre la bioaccessibilité de l'As, du Cd et du Pb mesurée par le test UBM et celle
prédite par le test simplifié HCl dans les phases gastrique (G) et gastro-intestinale (Gl)
Figure 17 Relation entre la concentration de Sh mesurée par le test LIBM et celle extraite par le test
simplifié HCl dans les phases gastrique (G) et gastro-intestinale (GI)
Figure 18 Soil pH in the five contaminated soils (S1 S2 S3 S4 and S5) at T0 and T3 without (Control)
and with amendments (Biochar or Compost)
Figure 19, Bioaccessible Ni concentrations (mg kg ⁻¹) in S3 and S3 before (T0) and after (T3) soil aging
and without (Control) and with amendments (Riochar/Compost)
and without (control) and with amendments (blochal/composi)
rigure 20. Bioaccessible Cr concentrations (mg kg ⁻) in S1, S2, S4, and S5 before (10) and after (13) soil
aging and without (Control) and with amendments (Biochar/Compost). G: gastric phase; GI:
gastrointestinai phase
Figure 21. Cr (VI) concentrations (mg kg ⁻¹) in S2 and S4 before (T0) and after (T3) soil aging and without
(Control) and with amendments (Biochar/Compost)

Figure 22. Solid phase distribution of Cr and Ni in study soils S1 to S5 (expressed in % of pseudototal Figure 23. Relations entre la concentration de Ni dans les organes cibles et les 7 doses d'exposition Figure 24. Relations entre la concentration de Ni dans les organes cibles et les 6 doses d'exposition (0,044 - 0,714 mg kg⁻¹ PV j⁻¹) de Ni (Ni (II) hexahydraté)......151 Figure 25. Relations entre la concentration de Cr dans les organes cibles et les 7 doses d'exposition (0,02 - 0,55 mg kg⁻¹ PV j⁻¹) (Dichromate de sodium dihydraté)......152 Figure 26. Relations entre la concentration de Cr dans les organes cibles et les 5 doses d'exposition (0,02 - 0,18 mg kg⁻¹ PV j⁻¹) (Dichromate de sodium dihydraté)......152 Figure 27. Relations entre la concentration de Cr dans les organes cibles et les 7 doses d'exposition Figure 28. Relations entre la concentration de Cr dans les organes cibles et les 6 doses d'exposition Figure 29. Relations entre la concentration de Cr dans les organes cible et les 6 doses d'exposition (0,105 - 0,95 mg kg⁻¹ PV j⁻¹) (picolinate de chrome)......155 Figure 30. Schéma des points d'attention traités dans le cadre de la mise en œuvre de la méthodologie d'intégration de la bioaccessibilité orale dans l'évaluation de l'exposition et des risques sanitaires 161 Figure 31. Schéma du risque, croisement entre un danger et une exposition 165 Figure 32. Schéma tiré du logigramme des modalités de choix des VTR en France (N° Figure 33. Corrélations entre la bioaccessibilité gastrique ou intestinale relative (Bioacc rel (%)) déterminée par le test in vitro UBM et la biodisponibilité relative (BR (%)) déterminée à partir des données obtenues dans les organes (As n=13 ; Cd n=10 ; Pb n=14)...... 173 Figure 34. Graphical abstract illustrant la démarche expérimentale suivie sur cette étude pilote en lle-Figure 35. Location of the 45 soil samples collected in the Ile-de-France region. ACH1-2: two soil Figure 36. Experimental design from soil preparation protocols to bioaccessibility and total Figure 38. Differences between total Pb concentrations depending on the soil sample preparation Figure 39. Bioaccessibility percentages of Pb depending on the soil sample preparation method for total concentration measurements (sieved or milled) and statistical analysis of the differences 192 Figure 40. Number of soils for which the risk is acceptable (green) (HQ < 1) or unacceptable (red) (HQ Figure 41. Synthèse des pourcentages moyens de bioaccessibilité des EM dans la phase G et des effets des paramètres étudiés dans ces travaux sur la bioaccessibilité orale des EM et exemple du Cr 208 Figure 43. Démarche et recommandations opérationnelles pour l'évaluation des risques sanitaires et

Liste des Tableaux

Table 1. Effects of studied PTEs on human health9
Table 2. Overview of the common in vitro tests used to assess bioaccessibility of PTEs in soils 12
Table 3. Linear regression models for predicting in vivo PTE relative bioavailability (RBD) in
contaminated soils using in vitro bioaccessibility (BAc) in both gastric and gastrointestinal phases 15
Table 4. Summary of PTE bioaccessibility studies addressing correlations with soil properties
Table 5. List of studies cited in Table 4
Table 6. Overview of predictive models of PTE bioaccessibility in the gastric (G) and gastrointestinal
(GI) phases from soil properties
Table 7. Overview of recent articles using bioaccessibility (BAc) or bioavailability (RBA) data in risk
calculation for HHRA
Tableau 8. Concentrations totales en Cr, Ni, Cr VI et autres éléments métalliques des échantillons des
sols du lot 1
Tableau 9. Usages et concentrations totales en Pb des sols du Lot 2
Tableau 10. Synthèse des protocoles d'analyses des paramètres physico-chimiques des sols
Tableau 11. Synthèse des étapes de l'extraction séquentielle 70
Tableau 12. Formes de référence du Cr et du Ni utilisées dans ces travaux
Tableau 13. Formes de référence et doses d'exposition 74
Tableau 14. Equations de prédiction de la bioaccessibilité UBM à partir des concentrations extraites à
l'HCl (Pelfrêne et al., 2020)
Tableau 15. Tests statistiques utilisés dans les différentes études
Table 16. Soil parameters, pseudototal concentrations of Cr and Ni, and speciation of Cr for the 27 soil
samples
Table 17. Bioaccessibility (expressed in% of the pseudototal concentrations) measured in our study in
comparison to the data from the literature for Cr and Ni assessed by the UBM test
Table 18. Spearman correlation between BAc Cr and Ni (G and GI phases), soil physicochemical
parameters and their distributions (n = 27)
Table 19. Spearman correlation between the BAc G/BAc GI ratio and soil physicochemical parameters
Table 20. Regression models for Cr and Ni representing bioaccessible concentrations with the URM in
the gastric (C) and gastrointestinal (CI) phases as a function of extractable concentrations by HCL 107
Tableau 21. Concentrations totales on As. (d. Bh at Sh (avarimées on mg kg ⁻¹) dans les 24 sels de
l'étudo
Tableau 22 Synthèse de la distribution des nourcentages extraits (valeurs movennes, minimales et
maximales exprimées en % par rapport aux concentrations totales) dans les fractions de l'extraction
séquentielle (E1 E2 E3 et E4) et de BAc d'As Cd Db et Sh 118
Table 23 Soil and amendment characteristics
Table 24. Groups of mineralogical phases in initial soils and residues after LIBM extraction in the G and
GI nhases
Tableau 25. Synthèse des organes sélectionnés et des paramètres des relations dose-réponse pour les
trois formes de référence de cette étude
Tableau 26. Bioaccessibilités absolues des formes de référence dans les phases G et GL (exprimées en
% par rapport aux concentrations totales $n = 5$).
Tableau 27. Biodisponibilités relatives (RBA) et bioaccessibilités relatives (RBAc) dans les phases G et
GI calculées pour le Ni (au regard de sa forme de référence) et pour le Cr (au regard des deux formes

de référence pour le Cr III et le Cr VI) dans les 9 sols sélectionnés pour la comparaison IVIV (données
exprimées en %)
Tableau 28. Informations toxicologiques et valeurs toxicologiques de référence 168
Tableau 29. Equations de la biodisponibilité relative (RBA) en fonction de la bioaccessibilité relative
(RBAc) de l'As, du Cd et du Pb dans les phases gastrique (G) et gastro-intestinale (GI) 174
Tableau 30. Bioaccessibilités absolues (BAc) dans la phase gastrique (G) et gastro-intestinale (GI) de
l'As, du Cd et du Pb mesurées dans les formes de références (données exprimées en % par rapport
aux concentrations totales, n = 5)174
Tableau 31. Equations de la biodisponibilité relative (RBA) en fonction des bioaccessibilités absolues
(BAc) dans le sol et la matrice de référence, et ce pour l'As, le Cd et le Pb (données exprimées en
%)
Table 32. Definitions of the parameters for human health risk assessments for the five exposure
scenarios185
Table 33. Physico-chemical characteristics of the soil samples studied (n = 45)
Table 34. Summary statistics for predicted Pb bioaccessibility (BAc) based on HCl extraction and Pb
BAc measured using UBM in the gastric (G) and gastrointestinal (GI) phases (expressed as % of
pseudototal concentrations)
Table 35. Spearman correlation between soil parameters and Pb bioaccessibility
Table 36. Hazard quotient (HQ) based on five scenarios according to three methodologies 193
Tableau 37. Synthèse des moyennes des BAc (%) et des extraits dans les fractions mobilisables (F1+F2)
de l'extraction séquentielle (%) des sols du lot 1 204

Préambule

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans le cadre du projet de recherche Bioac'ERS ("La bioaccessibilité orale : un outil de caractérisation des expositions de l'Homme pour améliorer les évaluations de risques sanitaires"), soutenu par l'ADEME (APR GESIPOL 2020). Les partenaires de ce projet sont Junia ISA, l'Ineris, Tesora, le L2A de l'Université de Lorraine, Wessling et la Ville de Paris (en collaboration avec le laboratoire d'Agronomie). Ce projet est également en lien avec un groupe de travail national constitué à la demande du Ministère en charge de l'environnement et piloté par l'Ineris, et dédié à la rédaction d'un guide opérationnel sur la mise en œuvre de la bioaccessibilité orale des métaux et métalloïdes dans les sols dans les études des évaluations des risques sanitaires (2022-2024).

Cette thèse est soutenue par l'ADEME, Junia ISA, l'Ineris et Tesora. Chacune de ces structures implique une personne dans l'accompagnement de ma thèse : Aurélie PELFRENE (Directrice, Junia ISA) ; Corinne HULOT (Co-encadrante, Ineris) ; Benjamin PAUGET (Co-encadrant, Tesora) ; Franck MAROT (Responsable ADEME). Ces travaux de thèse ont été réalisés principalement au sein du LGCgE (Laboratoire de Génie Civil et géo-Environnement) à Junia ISA Lille, notamment pour mener toutes les expérimentations, et des déplacements réguliers ont été effectués à l'Ineris pour réaliser quelques analyses chimiques et l'ensemble des dosages dans les différentes matrices.

Introduction générale

Nombreux sont les pays confrontés à la problématique de la contamination des sols en lien avec les potentiels risques liés à l'exposition de l'Homme et de l'environnement aux polluants présents dans les sols. En 2015, il a été estimé que plus de 10 millions de sites sont contaminés à travers le monde dont la moitié par des éléments métalliques (EM) (He et al., 2015). Cependant, le nombre de sites pollués et l'étendue des zones concernées sont difficiles à quantifier. Il est possible qu'aujourd'hui ce chiffre soit bien plus élevé à cause d'incertitudes liées à un manque de connaissances ainsi que par l'apparition de nouveaux contaminants (FAO et UNEP, 2021). En France, en août 2024, 10 564 sols sont référencés comme pollués sur le site Georisques du Ministère chargé de l'environnement. Parmi les EM d'intérêt figurent l'As, le Cd, le Pb, le Cr, le Ni, le Sb ou Hg à cause de leurs nombreux effets possibles sur la santé humaine (e.g., effets systémiques : cardiovasculaires, rénaux, neurologiques, hématologiques, immunologiques ; cancérogènes, mutagènes, reprotoxiques). Les sources des EM sont d'origines multiples, et peuvent être à la fois naturelles et anthropiques. Parmi les sources anthropiques d'EM se trouvent les activités industrielles telles que la fabrication d'acier, la teinture, la fabrication de batteries, les fonderies, les exploitations minières, la combustion de charbon ou de carburants fossiles et les pratiques agricoles comme l'utilisation d'engrais ou de pesticides (Ayangbenro & Babalola, 2017). Les EM peuvent également être d'origine géogène et provenir des roches mères riches en EM, ayant été libérés lors de l'érosion et l'altération des roches ou à la suite d'éruptions volcaniques (Ayangbenro & Babalola, 2017 ; Cox et al., 2017 ; Moreira et al., 2018).

En parallèle de la problématique des sites et sols pollués (SSP), la population mondiale augmente rapidement et devrait atteindre 9,7 milliards d'habitants d'ici 2050. Cette évolution démographique s'accompagne d'une urbanisation croissante. Il est estimé que la population urbaine devrait atteindre 68% en 2050 contre 55% en 2018 (UNDESA, 2019). Ensemble, elles exercent une pression sur le foncier disponible et donc sur le bien-être et la qualité de vie de la société (Profiroiu et al., 2020). Les espaces dans lesquels les populations peuvent vivre sans être exposées à des composés potentiellement toxiques se réduisent alors que les villes s'expandent. Face à ces diverses pressions, le besoin de reconquérir les zones délaissées urbaines ou périurbaines devient crucial afin de préserver les espaces naturels, agricole et forestiers, et ce en réutilisant et valorisant les zones déjà artificialisées. Ce besoin est retranscrit dans l'objectif de zéro artificialisation nette de la loi climat et résilience (2021) en France, ainsi que dans la directive européenne à la surveillance et à la résilience des sols. Cependant, cette reconquête de délaissés urbains, présentant pour la plupart des sols contaminés, doit se faire en s'assurant de la préservation de la santé Humaine et environnementale en accord avec la

méthodologie nationale de gestions des sites et sols pollués (i.e. les démarches Interprétation de l'Etat des Milieux (IEM) ou Plan de Gestion (PG) (MTES, 2017)). A l'issue de ces démarches, des mesures des solutions de gestion (incluant le traitement des pollutions) peuvent être proposées dont certaines peuvent s'avérer très coûteuses. Afin de pouvoir dimensionner au mieux ces solutions de gestion, la mise en œuvre en amont de l'évaluation des risques sanitaires doit s'avérer la plus réaliste possible. Le risque étant la résultante d'une exposition à un danger, il convient de définir le plus précisément possible les scénarios d'exposition, à savoir les sources de pollution, les voies de transfert, et les enjeux à protéger. Les EM présents dans les sols peuvent exposer de manière directe les individus par l'inhalation de poussières, le contact cutané et l'ingestion non intentionnelle de particules de sol et de poussières (Paustenbach, 2000). L'ingestion non intentionnelle de sol est la voie majeure d'exposition pour les EM non volatils, notamment chez les jeunes enfants du fait des comportements main-bouche (Ruby et al., 1996 ; Zingaretti & Baciocchi, 2021) ; mais également chez la population générale lors d'activités de loisirs, de jardinage ainsi que pour les agriculteurs ou les jardiniers exposés lors du travail du sol et de la récolte des végétaux. Classiquement, pour caractériser les risques associés à l'ingestion non intentionnelle de sol et quantifier la dose d'exposition (i.e. contaminant ingéré qui atteindra les sites d'action dans les organes cibles), c'est la concentration totale de l'EM dans la matrice ingérée qui est prise en compte. Cependant, seule la fraction biodisponible est assimilée par le corps humain et est capable d'atteindre les organes cibles et de générer des effets toxiques (Ruby et al., 1999). Estimer l'exposition uniquement sur la base de la concentration totale des contaminants peut donc surestimer le risque réel et conduire à conclure à des risques inacceptables à tort pour les usages étudiés. Ainsi, soit des travaux de dépollution sont mis en œuvre alors qu'ils n'étaient pas nécessaires, soit leur choix n'est pas optimal en termes de technique, de coût ou de dimensionnent. In fine, cela peut conduire à des changements d'usage ou la mise en place de servitude voir même aller jusqu'à l'abandon du projet. Pour ces raisons, une caractérisation plus réaliste des expositions est cruciale dans les processus d'évaluation des risques sanitaires et de gestion des SSP.

Parmi les outils et méthodes disponibles, la mesure de la biodisponibilité orale permet une estimation réaliste de l'exposition. Or, sa mesure implique d'avoir recours à des expérimentations *in vivo* sur l'animal, qui sont longues, coûteuses et éthiquement discutables. La biodisponibilité est le résultat de trois étapes successives : la phase de solubilisation dans les fluides digestifs, l'absorption à travers l'épithélium intestinal, et la métabolisation hépatique (RIVM, 2006) (Figure 1). La bioaccessibilité correspond à la fraction de contaminants solubilisés par les fluides digestifs et donc le maximum disponible à l'assimilation (Semple et al., 2004). Comme il s'agit d'une phase de solubilisation, des tests *in vitro* plus ou moins complexes ont été développés pour la mimer, mais requièrent une validation au regard des modèles *in vivo* pour être considérés comme des proxy pertinents. L'accès à des méthodes validées pour estimer la biodisponibilité à travers la bioaccessibilité permet ainsi d'affiner l'évaluation

des expositions et des risques, de formuler des recommandations plus réalistes et de réduire les coûts de remédiation des sites, tout en assurant la maitrise des risques sanitaires.



Figure 1. Schématisation du devenir des contaminants dans le système digestif : notions de biodisponibilité et bioaccessibilité orale

En France, la méthodologie nationale de gestion des sites et sols pollués (MTES, 2017) cadre l'utilisation de la bioaccessibilité dans les deux démarches de gestion (IEM et PG) et recommande l'utilisation du test UBM (Unified Bioaccessibility Method ; ISO 19724:2019). Cette méthode est validée au regard d'un modèle *in vivo* (le porcelet) pour l'As, le Cd et le Pb. Malgré cela, celle-ci n'est pas encore suffisamment intégrée comme outil dans l'évaluation des risques sanitaires pour la gestion des sites pollués. Cela s'explique par : (1) un manque de sensibilisation et de connaissance des tests de bioaccessibilité, (2) le nombre restreint d'EM pour lesquels les tests sont généralement validés *in vivo* ainsi que le coût élevé du test UBM, et enfin, (3) les difficultés opérationnelles notamment pour intégrer la bioaccessibilité dans l'estimation de la bioaccessibilité, d'étendre la validation du test UBM à d'autres EM et d'améliorer sa prise en compte lors de l'estimation de l'exposition orale humaine.

À la suite de ces constats, mes travaux de thèse s'inscrivent dans une démarche générale d'amélioration de la caractérisation des expositions des populations lors des calculs de risques sanitaires et plus particulièrement à l'amélioration de la prise en compte de la bioaccessibilité.

Ainsi, pour répondre à cet objectif global, les travaux de ce manuscrit s'articulent en cinq chapitres :

- (1) Le premier chapitre est un état de l'art sur la bioaccessibilité orale des EM (As, Cd, Cr, Ni, Pb, Sb) publié sous forme d'une revue bibliographique. Il présente les différentes méthodes *in vitro*, les gammes de valeurs, les facteurs d'influence, l'utilisation des données de bioaccessibilité orale lors des évaluations de risques sanitaires et les incertitudes ainsi que les manques de connaissances, et ce, à l'échelle internationale. S'en suit une synthèse, pour en arriver à l'état de l'utilisation de la bioaccessibilité en France, permettant ainsi de dégager les objectifs, et questions scientifiques de mes travaux de thèse ainsi que la démarche entreprise pour répondre à ces besoins.
- (2) Le second chapitre présente les matériels et méthodologies utilisés pour les différentes expérimentations conduites dans mes travaux de thèse.
- (3) Le troisième chapitre porte plus particulièrement sur deux EM que sont le Cr et le Ni pour lesquels le test UBM n'a pas encore fait l'objet d'étude de la validation *in vivo*. Il se divise en trois parties : (i) La première présente l'étude de la bioaccessibilité du Cr et du Ni , l'influence de la matrice du sol (paramètres physico-chimiques), de l'origine de la contamination, de la distribution dans les phases porteuses et de la spéciation du Cr sur la bioaccessibilité ainsi que le potentiel de l'utilisation du test simplifié HCl pour prédire la bioaccessibilité du Cr et Ni mesurée par le test UBM; (ii) La seconde présente l'influence de la temporalité en combinaison ou non d'amendements (biochar ou compost) sur la bioaccessibilité ; (iii) La dernière vise à comparer les données *in vitro* de bioaccessibilité à des données de biodisponibilité obtenues au travers d'essais *in vivo* sur des porcelets en vue d'étudier la validation du test UBM.
- (4) Le quatrième chapitre est une étude opérationnelle de l'application de la bioaccessibilité. Il se divise en deux parties : (i) La première s'intéresse à l'intégration de la bioaccessibilité dans les évaluations des risques sanitaires et à la proposition d'une nouvelle démarche plus particulièrement pour l'As, le Cd et le Pb ; (ii) La seconde illustre la démarche proposée dans le cas du Pb par une étude pilote sur des sites pilotes d'Ile-de-France.
- (5) Le cinquième et dernier chapitre est une discussion générale qui présente les conclusions de mes travaux, les apports à la communauté scientifique, les implications dans la caractérisation des risques dans les gestions des SSP, ainsi que les perspectives de ce travail.

Chapitre 1 : La bioaccessibilité orale des éléments métalliques dans les sols

L'ampleur des sites contaminés, combinée à la pression démographique et à l'urbanisation croissante, fait de la caractérisation et la gestion de la contamination des sols des défis majeurs à l'échelle mondiale. Les enjeux liés à cette contamination sont multiples : sociétaux avec des espaces délaissés, des risques sanitaires et de la pollution visuelle ; financiers avec des coûts de gestion des sites à passifs; et environnementaux avec la perte de fonctions et de biodiversité des sites. Pour les contaminants métalliques présents dans les sols, le risque sanitaire est principalement lié à l'ingestion non intentionnelle de particules de sol, notamment chez l'enfant du fait de son comportement mainbouche lors d'activités de loisirs, mais aussi lors d'activités pédagogiques de jardinage, ainsi que pour les adultes travailleurs tels que les agriculteurs ou les jardiniers exposés par le travail du sol et lors de la récolte des végétaux. L'évaluation des risques sanitaires pour l'Homme, liés à l'ingestion non intentionnelles de particules de sols contaminées, demeure un domaine soumis à des incertitudes dans les démarches de protection sanitaire. En effet, des écarts importants sont observés entre les outils prédictifs d'évaluation des expositions (par la prise en compte des concentrations totales) et l'exposition réelle des populations (par la prise en compte de la biodisponibilité). Cela souligne la nécessité d'une évaluation plus réaliste des expositions pour orienter plus efficacement les mesures de gestion des sites et sols pollués (SSP).

L'intégration des concepts de biodisponibilité et de bioaccessibilité orales est aujourd'hui reconnue pour améliorer l'évaluation des expositions et des risques. En effet, la mesure de la bioaccessibilité orale (BAc) au moyen de tests *in vitro* en laboratoire permet une estimation plus réaliste de l'exposition humaine aux contaminants présents dans les sols. Un état des connaissances sur la BAc des EM dans les sols est présenté sous forme d'une revue de la littérature, intitulée « Oral bioaccessibility of PTEs in soils: A review of data, influencing factors and application in human health risk assessment » publiée dans le journal Science of the Total Environment (10.1016/j.scitotenv.2023.165263).

Dans cette revue sont recensés :

- les méthodes d'extraction *in vitro* les plus courantes pour la caractérisation de la BAc et leur état de validation au regard des études *in vivo*, et les gammes de BAc ;
- les facteurs d'influence de la BAc ;
- l'utilisation de la BAc lors de l'évaluation des expositions et des risques sanitaires.

Elle a ainsi permis de mettre en évidence les connaissances actuelles, les points d'attention et les perspectives qui seront étudiés dans ces travaux. Cet état de l'art ainsi que ce manuscrit de manière

générale s'intéressent à la BAc des EM parmi les plus préoccupants pour l'Homme et couramment retrouvés dans le domaine des SSP, à savoir As, Cd, Cr, Ni, Pb et Sb. Bien qu'également préoccupant, le Hg n'est pas étudié dans ces travaux, à cause de ses différentes formes, dont pour le mercure élémentaire dont la nature volatile rend son étude plus complexe, tant dans le cadre des essais *in vivo* qu'*in vitro* et que la voie d'exposition associée est l'inhalation.

1.1. Etat des connaissances



Review

Oral bioaccessibility of PTEs in soils: A review of data, influencing factors and application in human health risk assessment



Madeleine Billmann^{a,b}, Corinne Hulot^c, Benjamin Pauget^d, Rabia Badreddine^c, Arnaud Papin^c, Aurélie Pelfrêne^{a,*}

- ^a Univ. Lille, IMT Nord Europe, Univ. Artois, JUNIA, ULR 4515-LGCgE, Laboratoire de Génie Civil et géo-Environnement, 48 boulevard Vauban, F-59000 Lille, France
- ^b Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie, 20 avenue du Grésillé BP 90406, F-49004 Angers Cedex 01, France
- ^c Ineris, Parc technologique Alata, BP 2, F-60550 Verneuil-en-Halatte, France

^d Tesora, 22 avenue Aristide Briand, F-94110 Arcueil, France



Graphical abstract

Abstract

Understanding the behavior of metal(loid)s transported from soil to humans is critical for human health risk assessment (HHRA). In the last two decades, extensive studies have been conducted to better assess human exposure to potentially toxic elements (PTEs) by estimating their oral bioaccessibility (BAc) and quantifying the influence of different factors. This study reviews the common *in vitro* methods used to determine the BAc of PTEs (in particular As, Cd, Cr, Ni, Pb, and Sb) under specific conditions (particularly in terms of the particle size fraction and validation status against an in vivo model). The results were compiled from soils derived from various sources and allowed the identification of the most important influencing factors of BAc (using single and multiple regression analyses), including physicochemical soil properties and the speciation of the PTEs in question. This review presents current knowledge on integrating relative bioavailability (RBA) in calculating doses from soil ingestion in the HHRA process. Depending on the jurisdiction, validated or non-validated bioaccessibility methods were used, and risks assessors applied different approaches: (i) using default assumptions (i.e., RBA of 1); (ii) considering that bioaccessibility value (BAc) accurately represents RBA (i.e., RBA equal to BAc); (iii) using regression models to convert BAc of As and Pb into RBA as proposed by the USA with the US EPA Method 1340; or (iv) applying an adjustment factor as proposed by the Netherlands and France to use BAc from UBM (Unified Barge Method) protocol. The findings from this review should help inform risk stakeholders about the uncertainties surrounding using bioaccessibility data and provide recommendations for better interpreting the results and using bioaccessibility in risk studies.

Keywords: Contaminated soils; Metal(loid)s; Bioaccessibility; Bioavailability; Soil parameters; Human health risk assessment

1.1.1. Introduction

Soils serve as sinks for many metallic elements derived from human activities, including past or present mining activities, industrial activities (such as steel manufacturing, plating, dyeing, battery manufacturing, smelting, coal, or fossil fuel combustion), waste disposal, and agricultural practices (such as the use of fertilizers or pesticides), depending on the soil type and soil use. Additionally, soils may inherit metallic elements from natural geochemical origin, volcanic eruptions or parent materials, because many minerals contain high concentrations of elements that are released into the environment through actions such as weathering and erosion (Ayangbenro and Babalola, 2017; FAO and UNEP, 2021; He et al., 2015). These potentially toxic elements (PTEs) pose a risk to human health because of their toxicity, especially in sensitive populations such as children. Compared with

inhalation and dermal contact, unintentional ingestion of soil particles, especially for children through outdoor activities (i.e., hand-to-mouth contact), is considered the primary route of exposure for PTEs (Paustenbach, 2000; Ruby et al., 1996; Zingaretti and Baciocchi, 2021).

Over 10 million soil contamination sites have been reported worldwide, half contaminated with PTEs (He et al., 2015). In the context of managing contaminated sites, there is now a consensus that human health risk assessment (HHRA) may overestimate exposure and risk based on total (or pseudo-total) PTE concentrations in the soil (i.e., considering that the entire amount of a contaminant is available to human organs) (Ikegami et al., 2014; Izquierdo et al., 2015; Monneron-Gyurits et al., 2020). A lack of realism can result in excessive management costs. Soil particles ingested by humans enter the digestive system, where they encounter several compartments with different properties that affect the dissolution and absorption of contaminants in the soil matrix. Only the bioavailable fraction, the quantity of PTEs that reaches the bloodstream and human organs, can generate toxic effects (Ruby et al., 1999; Semple et al., 2004). However, measuring oral bioavailability requires in vivo experiments, that are time-consuming, expensive, and ethically questionable. Therefore, oral bioaccessibility can be used to incorporate the concept of bioavailability into human health risk assessments (HHRA). It is defined as the fraction of PTEs soluble in the gastrointestinal tractus and potentially available for absorption (Oomen et al., 2002; Ruby et al., 1999). Research on bioaccessibility related to contaminated site management has gained international attention as it can lead to a more balanced risk assessment (Babaahmadifooladi et al., 2020; Darko et al., 2017; Li et al., 2014; Mehta et al., 2019; Wang et al., 2023a).

In the last two decades, numerous *in vitro* extraction methods have been developed for application into PTE-contaminated soils. However, to refine the exposure method and HHRA, the bioaccessible concentrations of PTEs obtained from validated and standardized protocols (i.e., *in vivo* and interlaboratory assays) are recommended. Priority PTEs have been identified as As and Pb (Denys et al., 2012; González-Grijalva et al., 2019; Karadaş and Kara, 2011; Pelfrêne et al., 2011; Ruby et al., 1996; Zapusek and Lestan, 2009) because of their adverse effects on human health (Table 1) and their prevalence in soils worldwide. Studies have also been conducted on other elements, such as Cd, which exhibits high toxicity even at very low concentrations (Kumar and Sharma, 2019; FAO and UNEP, 2021). Other PTEs, such as Cr, Ni, and Sb, have received less attention; however, their interest is increasing because they can also have adverse effects on human health (Table 1), and their bioaccessibility is often estimated to be relatively low (Amponsah et al., 2022; Bourliva et al., 2021; Cavonas et al., 2023; Denys et al., 2008; Guillen et al., 2021; Kirman et al., 2016; Laha et al., 2020; Li et al., 2014; Ning et al., 2021; Pascaud et al., 2014; Pereira et al., 2020). The toxicities of certain PTEs are influenced by their speciation. When ingested, Cr (III) is absorbed less by the human body than carcinogenic Cr (VI) (Kerger et al., 1996), underscoring the importance of studying Cr speciation in the

HHRA (Yu et al., 2012). As and Sb are primarly present as As/Sb (V) and As/Sb (III), with the latter being more toxic than As/Sb (V) (Bagherifam et al., 2019; Filella et al., 2002). Therefore, this review focuses on PTEs such as As, Cd, Cr, Ni, Pb, and Sb, which are essential in HHRA. Studies have also been conducted on Hg (e.g., Bavec and Gosar, 2016; Rodrigues et al., 2014; Vasques et al., 2020; Welfringer and Zagury, 2009). However, this PTE was excluded from the review because of its volatile nature and the difficulty in estimating its bioaccessible and bioavailable fractions. Because only a fraction of contaminants in the soil may reach the bloodstream and cause toxic effects, and to improve the representativeness of the characterization of human exposure, it is essential to incorporate the oral bioaccessibility of these PTEs in HHRA. A site-specific approach is also necessary because bioaccessibility depends on the contaminant and soil type (Oomen et al., 2002). Two ISO standards, ISO 17402 (2011) and ISO 17924 (2019) are based on bioavailability and(or) bioaccessibility for exposure or risk assessment. However, some existing frameworks for the use of oral bioaccessibility in contaminated soil management (Environment Agency, 2009; Grøn and Andersen, 2003; Health Canada, 2017; MTES, 2017; Ng et al., 2015; Oomen et al., 2006; US EPA, 2007) recommend using bioaccessibility as a corrective factor for the total concentration, allowing for a more realistic estimation of exposure in risk calculations. Nevertheless, several aspects have not been sufficiently explained, including the appropriate conditions and good practices for using bioaccessibility.

PTE	Effect on Human
Antimony	Cancer, cardiovascular diseases, conjunctivitis, dermatitis, liver diseases, nasal ulceration, blood, gastrointestinal and neurological dysfunction
Arsenic	Circulatory diseases, acute toxicity, dermatitis, skin cancer, blackfoot disease, proximal tubule degeneration, papillary and cortical necrosis, peripheral neuropathy, encephalopathy, hepatomegaly, cirrhosis, altered heme metabolism, diabetes, bone marrow depression, brain damage, cardiovascular disorder, conjunctivitis.
Cadmium	Adverse effects on kidneys, nephrotoxicity, bone disease, emphysema, headache, hypertension, itai-itai, kidney diseases, prostate cancer, lymphocytosis, microcytic hypochromic anemia, testicular atrophy, vomiting
Chromium	Emphysema, irritation of the skin, liver diseases, nausea, renal failure, reproductive toxicity, vomiting, skin rashes, weakened immune systems, kidney failure, alteration in genetic material, cardiovascular collapse in humans
Lead	Neurotoxic response, damage to neurons in children, impaired IQ, anorexia, chronic nephropathy, high blood pressure, hyperactivity, insomnia, learning deficits, reduced fertility, renal system damage, shortened attention span, various deleterious effects on the hematopoietic and central nervous system.
Nickel	Increased reactivity in Ni allergic persons, cardiovascular diseases, chest pain, dermatitis, dizziness, headache, kidney diseases, nausea Ni can be substitute to oligo-elements and disrupt metabolic pathways

Table 1. Effects of studied PTEs on human health

Abdul et al., 2015; Assi et al., 2016; Ayangbenro and Babalola, 2017; Blais et al., 2008; FAO and UNEP, 2021; Flora et al., 2012; Grøn and Andersen, 2003; Raj and Maiti, 2020; Wang et al., 2023b; Zhitkovich, 2005

After presenting the common *in vitro* methods used to determine the oral bioaccessibility of PTEs, the objective of this review is to provide an overview of the current state of knowledge regarding (i) the ranges of PTEs bioaccessibility in soils; (ii) the factors that influence the oral bioaccessibility of As, Cd, Cr, Ni, Pb, and Sb in soils; and (iii) the use of bioaccessibility in HHRA and contaminated soil management on an international scale. This literature review aims to inform risk stakeholders about some points of attention surrounding the use of bioaccessibility data, mainly the information that should be collected and the links between factors and bioaccessibility, and to interpret better the results and use of bioaccessibility in risk studies.

1.1.1. Common in vitro extraction procedures for predicting bioaccessibility of PTEs

In vitro chemical extraction methods have been developed to substitute in vivo animal assays (Li et al., 2021). The most commonly used methods (Table 2) include the Physiologically Based Extraction Test (PBET; Ruby et al., 1996), the Solubility/Bioavailability Research Consortium method or Relative Bioavailability Leaching Procedure (SBRC or RBALP; Kelley et al., 2002), the US EPA Method 1340 (US EPA, 2017a, 2017b, 2021)derived from SBRC (only the gastric phase) and SBET (the Simple Bioaccessibility Extraction Test; Medlin, 1997), the *In vitro* Gastrointestinal test (IVG; Rodriguez et al., 1999) and its modified version (Basta et al., 2007) without dosing vehicle, the Deutsches Institut für Normung method (DIN 19738; Hack et al., 2002), and the Unified BARGE Method (UBM; Denys et al., 2012; ISO 17924, 2019) which is derived from the Dutch National Institute for Public Health and the Environment method (RIVM; Oomen et al., 2003). Moreover, more recently, a modified extraction procedure (the California Arsenic Bioaccessibility Method, CAB; California DTSC, 2015) was developed to improve the prediction of As bioavailability (Whitacre et al., 2017). Previous studies have compared the results of different in vitro tests using the same soil samples and have concluded that bioaccessibility values could vary significantly (De Miguel et al., 2012; Kierulf et al., 2022; Koch et al., 2013; Li et al., 2021; Oomen et al., 2002; Van de Wiele et al., 2007; Wragg et al., 2003; Zingaretti and Baciocchi, 2021). Indeed, the results are not generally comparable between tests, and data on the quality of bioaccessibility test methods are limited. The differences, which can sometimes be high (a factor of two between bioaccessibility estimated with a different method is highlighted), can be explained by variations in the protocols used, including (i) the physiological compartments included and their residence time, (ii) the pH of each compartment, (iii) the composition of the simulated digestive fluids, (iv) the solid-liquid (S: L) ratio of the soil sample and digestive fluids, (v) the inclusion of food during the test, and (vi) other sensitive parameters (e.g., mode of agitation,, aerobic or anaerobic conditions, soil sample preparation, and the fraction considered). Differences in the pH of the acidic gastric digestion phase are given as the most likely

explanation for the poor correspondence obtained with different *in vitro* tests (Bagherifam et al., 2019; Li et al., 2019; Oomen et al., 2002; Smith et al., 2014).

As previously mentioned, *in vitro* tests vary according to different parameters. Some are important because they influence the bioaccessibility results, ultimately impacting the strength of the *in vivo* - *in vitro* correlation (IVIVC). The IVIVC is crucial for determining the validity of bioaccessibility assays as surrogate measures for refining bioavailability for human exposure and risk. The validation of these *in vitro* methods involves comparing the bioaccessibility and bioavailability results obtained from animal experiments. The exact definitions and prerequisites for validation are still under debate, although an approach has been published by the US EPA (2007). The objective was to determine whether there was a sufficiently robust linear correlation to estimate the bioavailability of a PTE from its bioaccessibility in solutions simulating digestive fluids. Criteria for validity were identified to judge the robustness of the

Method	Phase	Fluid composition (L ⁻¹)	рН	S:L ratio	Duration	PTEs	Particle size fraction	Reference
SBRC	Gastric	30.03 g glycine	1.5	1:100	1 h	As, Cd,	<250 µm	Kelley et al.,
	Intestinal	1.75 g bile, 0.5 g pancreatin	7	1:100 4 h Pb		Pb		(2002)
PBET	Gastric	1.25 g pepsin, 0.5 g sodium malate, 0.5 g sodium citrate, 0.42 mL lactic acid, 0.5 mL acetic acid		1:100	1 h	As, Pb	<250 μm	Ruby et al., (1996)
	Intestinal	1.75 g bile, 0.5 g pancreatin	7	1:100	4 h			
IVG	Gastric	10 pepsin, 8.77 g NaCl	1.8	1:150	1 h	As, Pb	<250 μm	Rodriguez and Basta, 1999
	Intestinal	3.5 g bile, 0.35 g pancreatin	5.5	1:150	1 h			
DIN	Gastric	1 g pepsin, 3 g mucin, 2.9 g NaCl, 0.7 g KCl, 0.27 g KH ₂ PO ₄	2	1:100	2 h	As, Pb,	<2 mm	Hack et al.,
	Intestinal	9.0 g bile, 9.0 g pancreatin, 0.3 g trypsin, 0.3 g urea, 0.3 g KCl, 1 g NaHCO_3, 0.5 g CaCl_2, 0.2 g MgCl_2	7.5	1:100	3 h Cd, Cr, Ni, Hg		(2002); DIN 19738	
UBM	Saliva	0.45 g KCl, 0.44 g NaH ₂ PO ₄ , 0.1 g KSCN, 0.28 g Na ₂ SO ₄ , 0.15 g NaCl,0.1 g urea, 0.15 g amylase, 50 mg mucin, 15 mg uric acid, NaOH	6.5	1:15	10 s	As, Cd, <250 μm Pb		Denys et al., (2012); ISO 17924
	Gastric	1.85 g NaCl, 0.163 g NaH ₂ PO ₄ , 0.41 g KCl, 0.2 g CaCl ₂ , 0.15 g NH ₄ Cl, 0.32 g glucose, 20 mg glucuronic acid, 40 mg urea, 165 mg glucosamine hydrochloride, 1.0 g BSA, 3.0 g mucin, 1.0 g pepsin, HCl	1.2	1:37.5	1 h			(2019)
	Intestinal	Duodenal: 3.5 g NaCl, 2.8 g NaH ₂ PO ₄ , 40 mg KH ₂ PO ₄ , 0.28 g KCl, 25 mg MgCl ₂ , 50 mg urea, 0.2 g CaCl ₂ , 1.0 g BSA, 3 g pancreatin, 0.5 g lipase	6.3	1:97.5	4 h			
		Bile: 2.6 g NaCl, 2.9 g NaHCO ₃ , 0.18 g KCl, 0.12 g urea, 0.2 g CaCl ₂ , 1.8 g BSA, 6.0 g Bile, HCl						
Method 1340	Gastric	30.03 g glycine, HCl	1.5	1:100	1 h	As, Pb	<150 µm	US EPA (2017a)

Table 2. Overview of the common in vitro tests used to assess bioaccessibility of PTEs in soils

SBRC: Solubility/Bioavailability Research Consortium; PBET: Physiologically Based Extraction Test; IVG: *In vitro* Gastrointestinal test; DIN: Deutsches Institut für Normung; UBM: Unified Barge Method; Method 1340: *in vitro* bioaccessibility test from US EPA

correlation. These are (i) a statistically significant linear correlation (close to 1, in practice $R^2 > 0.6$); (ii) a sufficiently wide range of bioavailability values tested (an interval of approximately 70% between the minimum and maximum values), which should make it possible to validate the correlation for different types of soil, thus theoretically enabling its use regardless of the study site; (iii) a good distribution of values in the range of bioavailability. In addition, the in vitro bioaccessibility test must be repeatable and reproducible, similar to any other experimental protocol. The criteria are intralaboratory repeatability (RSD or CV) < 10% and interlaboratory reproducibility (RSD or CV) < 20%. Wragg et al., (2011) adapted these guidelines to evaluate regression parameters and determine an acceptable IVIVC. Acceptable parameters included a slope close to 1 (in practice, between 0.8 and 1.2), r value > 0.8, and $R^2 > 0.6$. In addition to the slope and R^2 , Juhasz et al., (2013) suggested that the y-intercept should be zero. Table 3 summarizes several studies' comparisons between the *in vitro* and *in vivo* methods. Linear regression models were also provided for predicting the in vivo relative bioavailability of PTEs (As, Cd, and Pb) in contaminated soils using *in vitro* bioaccessibility tests. Relative bioavailability was measured as the contaminant uptake in the target organ from the soil matrix relative to the uptake from a readily soluble salt of the contaminant (reference matrix). In general, methods for measuring the bioaccessibility of Pb have been validated with good results for the US EPA Method 1340 (RBALP or SBET), PBET, UBM, RIVM, and IVG tests. Among these tests, the Method 1340 met the maximum criteria for validation, and the RIVM and UBM tests. For As, validations were observed for the Method 1340, IVG, CAB, RIVM, PBET, and DIN tests. Similarly, for Cd, the methods listed for As yielded valid results. These results are consistent with those reported by Li et al., (2019), where IVIVC where established based on large sample sizes from different studies. For As, linear regression coefficient of determination (R²) values are for the best extraction phase of each in vitro test: SBRC-G (0.73, n =107)> UBM-GI (0.71, n =63)> IVG-G (0.65, n = 102) > PBET-G (0.54, n = 60) > DIN-G (0.52, n = 47). For Pb, UBM-G (0.75, n = 36) > PBET-G (0.73, n =27)> SBRC-G (0.52, n = 94)> IVG G (0.48, n = 138). For Cd, UBM-G (0.72, n =22)> DIN-G (0.65, n = 7) > PBET-GI (0.59, n = 19)> SBRC-GI (0.44, n = 19) > IVG-G (0.39, n = 29). The study by Li et al., (2019) is critical for validating in vitro tests, as some have only been validated for a few soils (even if R² > 0.6) (i.e., DIN-G for Cd, R² = 0.65 and n=7). This is consistent with the report of Basta et al., (2016), which was a comprehensive study comparing key in vitro methods (Method 1340, UBM, IVG without dosing vehicle, PBET and CAB), based on 27 As-contaminated soils and two animal models (adult mouse and juvenile swine). The in vivo-in vitro correlation analysis showed that the five methods predicted the relative bioavailability for both bioassays. More specifically, linear regression coefficient of determination (R2) values were IVG (0.89) > UBM (0.84), PBET = Method 1340 (0.82) > CAB (0.74) using the mouse method, and IVG (0.73) > UBM (0.67), PBET (0.63) > Method 1340 (0.60) > CAB (0.54) using the swine method. In this report (Basta et al., 2016), swine As RBA (relative bioavailability) was greater than mouse As RBA but variability is larger for swine than mouse. This highlights the issue of the

choice of animal model. *In vivo* tests on the closest models to humans (primates or piglets) are more expensive and difficult to carry out than those on rodents (mouse). Studies agree that mouse model can serve as a highly cost-effective alternative to swine assays for As RBA assessment (Diamond et al., 2022) because for most soil samples they showed that RBA of swine was similar to mouse (Basta et al., 2016; Bradham et al., 2013; Diamond et al., 2016; Li et al., 2017). These studies also showed that sometimes the RBA estimated using the mouse model underestimates the RBA estimated using the swine model. This suggests that we should remain cautious of tests validated by a large number of *in vivo* tests, depending on the models used. Even if the study of Bradham et al., (2016) showed that the use of mouse model for Pb RBA assessment is promising, more tests are needed, in particular for other PTEs than As, to compare RBA obtained through mouse and swine model before starting using the mouse model for RBA assessment.

Initially, these tests were developed for one or few PTEs (mostly Pb, As, and Cd); however, they have been extended to various PTEs for which they have not yet been shown to be suitable analogs of *in vivo* conditions. An attempt to validate the UBM test for Sb was made but was incomplete (Denys et al., 2012), as the small bioaccessibility range covered in the study did not make the dataset suitable for calibrating Sb bioaccessibility measurements from *in vitro* testing methods.

ΡΤΕ	Number of soils	<i>In vitro</i> method	<i>In vivo</i> model	RBD equation in GP	RBD equation in GIP	Reference
As	10	IVG with food (dough)	Juvenile swine	1.299 BAc + 5.12 (R ² = 0.92)	1.887 BAc + 3.96 (R ² = 0.90)	Basta et al., (2007)
	10	IVG with food	Juvenile swine	1.07 BAc + 5.81 (R ² = 0.96)	1.22 BAc + 4.94 (R ² = 0.82)	Basta et al., (2007)
	40	SBRC	Mouse	0.65 BAc + 7.8 (R ² = 0.81)	-	Bradham et al., (2015)
	20	SBET (Method 1340)	Swine	0.62 BAc + 19.7 (R ² = 0.72)	-	Brattin et al., (2013)
	13	UBM	Juvenile swine	1.00 BAc + 0.01 (R ² = 0.98)	0.99 BAc - 0.04 (R ² = 0.97)	Denys et al., (2012)
	49	RBALP (or SBET)	Swine	0.93 BAc (mg/kg) + 14.19 (R ² = 0.92)	-	Juhasz et al., (2007b)
	12	SBRC	Swine	0.992 BAc + 1.656 (R ² = 0.75)	1.644 BAc + 5.626 (R ² = 0.65)	Juhasz et al., (2009a)
	12	IVG	Swine	0.853 BAc + 14.323 (R ² = 0.57)	1.105 BAc + 13.971 (R ² = 0.57)	Juhasz et al., (2009a)
	12	PBET	Swine	1.162 BAc + 10.096 (R ² = 0.64)	1.762 BAc + 5.682 (R ² = 0.66)	Juhasz et al., (2009a)
	12	DIN	Swine	1.774 BAc + 5.732 (R ² = 0.546)	1.46 BAc + 9.2 (R ² = 0.53)	Juhasz et al., (2009a)
	13	SBRC	Swine	0.62 BAc + 5.4 (R ² = 0.90)	0.51 BAc 19.1 (R ² = 0.61)	Juhasz et al., (2014b)
	13	IVG	Swine	0.59 BAc + 12.4 (R ² = 0.79)	0.59 BAc 17.5 (R ² = 0.67)	Juhasz et al., (2014b)
	13	PBET	Swine	0.56 BAc + 13.7 (R ² = 0.78)	0.56 BAc + 14.6 (R ² = 0.85)	Juhasz et al., (2014b)
	13	DIN	Swine	0.6 BAc + 11.1 (R ² = 0.90)	0.61 BAc + 12.6 (R ² = 0.88)	Juhasz et al., (2014b)
	13	UBM	Swine	0.59 BAc + 9.8 (R ² = 0.90)	0.55 BAc + 12.6 (R ² = 0.89)	Juhasz et al., (2014b)
	13	SBRC	Swine	0.69 BAc + 5.24 (R ² = 0.75)	1.02 BAc + 6.85 (R ² = 0.71)	Juhasz et al., (2014a, 2015)
	13	IVG	Swine	0.89 BAc + 5.14 (R ² = 0.69)	0.91 BAc + 6.06 (R ² = 0.62)	Juhasz et al., (2015)
	13	PBET	Swine	0.60 BAc + 10.20 (R ² = 0.59)	0.66 BAc + 8.42 (R ² = 0.56)	Juhasz et al., (2015)
	13	UBM	Swine	0.54 BAc + 4.53 (R ² = 0.70)	0.58 BAc + 5.91 (R ² = 0.74)	Juhasz et al., (2015)
	13	DIN	Swine	0.64 BAc + 9.03 (R ² = 0.63)	0.88 BAc + 5 (R ² = 0.53)	Juhasz et al., (2015)
	12	UBM	Mouse	-4.40 BAc + 0.97 (R ² = 0.66)	4.43 BAc + 1.09 (R ² = 0.80)	Li et al., (2015a)
	12	SBRC	Mouse	-0.60 BAc + 0.96 (R ² = 0.67)	8.22 BAc + 1.35 (R ² = 0.5	Li et al., (2015a)
	12	IVG	Mouse	-1.06 BAc + 1.29 (R ² = 0.83)	2.28 BAc + 1.35 (R ² = 0.81)	Li et al., (2015a)
	12	DIN	Mouse	12.1 BAc + 0.79 (R ² = 0.61)	4.52 BAc + 1.36 (R ² = 0.53)	Li et al., (2015a
	12	PBET	Mouse	8.59 BAc + 1.08 (R ² = 0.56)	9.46 BAc + 1.04 ($R^2 = 0.5$)	Li et al., (2015a)

Table 3. Linear regression models for predicting in vivo PTE relative bioavailability (RBD) in contaminated soils using in vitro bioaccessibility (BAc) in both gastric and gastrointestinal phases (GP and GIP, respectively)

	5	IVG	Mouse	0.87 BAc + 9.16 (R ² = 0.94)	-	Nagar et al., (2009)
	8	RIVM (S:L ratio of 1:1000)	Juvenile swine	0.802 BAc (R ² = 0.9083)	0.957 BAc (R ² = 0.796)	Oomen et al., (2006)
	8	RIVM (S:L ratio of 1:100)	Juvenile swine	1,88 BAc (R ² = 0.94)	5.18 BAc (R ² = 0,23)	Oomen et al, (2006)
	13	IVG	Juvenile swine	1.136 BAc + 2.02 (R ² = 0.83)	1.316 BAc + 1.36 (R ² = 0.82)	Rodriguez and Basta (1999)
	13	PBET	Juvenile swine	1.724 BAc - 1.724 (R ² = 0.51)	2.564 BAc - 0.07 (R ² = 0.75)	Rodriguez and Basta (1999)
Cd	10	UBM	Juvenile swine	1.04 BAc - 2.77 (R ² = 0.97)	1.06 BAc - 1.52 (R ² = 0.91)	Denys et al., (2012)
	7	SBRC	Mouse	0.991 BAc - 51.388 (R ² = 0.58)	1.522 BAc - 50.842 (R ² = 0.80)	Juhasz et al., (2010)
	7	IVG	Mouse	0.936 BAc - 29. 141 (R ² = 0.42)	1.578 BAc - 22.985 (R ² = 0.58)	Juhasz et al., (2010)
	7	PBET	Mouse	0.778 BAc - 14.765 (R ² = 0.75)	1.091 BAc - 5.14 (R ² = 0.835)	Juhasz et al., (2010)
	7	DIN	Mouse	0.863 BAc - 20.764 (R ² = 0.58)	1.805 BAc - 2.159 (R ² = 0.55)	Juhasz et al., (2010)
	10	IVG with food (dough)	Juvenile swine	5.263 BAc - 27.5 (R² = 0.55)	7.692 BAc - 5.07 (R ² = 0.80)	Schroder et al., (2003)
	10	IVG without food	Juvenile swine	1.667 BAc - 25.4 (R² = 0.86)	4.762 BAc - 25.8 (R ² = 0.54)	Schroder et al., (2003)
Pb	14	UBM	Juvenile swine	0.91 BAc - 1.69 (R ² = 0.93)	0.92 BAc - 1 (R ² = 0.89)	Denys et al., (2012)
	19	Method 1340 (RBALP or SBET)	Juvenile swine	0.878 BAc - 0.028 (R ² = 0.924)	-	Drexler et al., (2007)
	5	SBRC	Juvenile swine	-0.18 BAc + 25.26 (R ² = 0.12)	4.07 BAc + 6.84 (R ² = 0.14)	Juhasz et al., (2009b)
	10	RIVM (S:L ratio of 1:100)	Juvenile swine	1.27 BAc (R ² = 0.95)	1.45 BAc (R ² = 0.81)	Oomen et al., (2006)
	10	RIVM (S:L ratio of 1:1000)	Juvenile swine	0.93 BAc (R ² = 0.68)	0.86 BAc (R ² = 0.66)	Oomen et al., (2006)
	7	PBET	Rat	1.4 BAc + 3.2 (R ² = 0.93)	-	Ruby et al., (1996)
	18	IVG with food (dough)	Juvenile swine	2.56 BAc - 2.97 (R = 0.93)	100 BAc - 0.0002 (R = 0.80)	Schroder et al., (2004)
	18	IVG without food	Juvenile swine	1.54 BAc + 1.44 (R = 0.89)	100 BAc - 0.52 (R = 0.38)	Schroder et al., (2004)

RBA and BAc are expressed in%PBET: Physiologically Based Extraction Test; SBET: Simple Based Extraction Test; US EPA Method 1340: *in vitro* bioaccessibility test from US EPA; SBRC: Solubility/Bioavailability Research Consortium; RBALP: Relative Bioavailability Leaching Procedure; IVG: *In vitro* Gastrointestinal test; RIVM: Dutch Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu; UBM: Unified Barge Method; DIN: Deutsches Institut für Normung

1.1.2. Ranges of PTEs bioaccessibility data in soils

The gastric and gastrointestinal bioaccessibility ranges of the six PTEs of interest (As, Cd, Cr, Ni, Pb and Sb) are presented in Figure 2, and are based on the results pooled from different in vitro tests. The bioaccessibility values can range from 0 to 100%, depending on the study, the in vitro protocol, and the considered element. Specifically, for each PTE, the bioaccessibility ranges in both G and GI phases were considered in 10% increments, and the graphs show the percentages of studies that reported bioaccessibility values at each step. Further details are provided in the Supplementary Material (SM). The most available data were for Pb and As. Nearly half of the studies found As bioaccessibility values below 30% in both G and GI phases. These results follow those of the analysis of As RBA estimates in soils from various sites of regulatory interest (US EPA, 2012a), which showed that <5% of the RBA estimates exceeded 60%. In that way, in cases where the development of site-specific RBA estimates is not feasible, US EPA recommends using a default value of 60%. More than half of the studies found bioaccessibility ranges of Pb and Cd below 50% and 60% in the G phase and below 30% and 40% in the GI phase respectively. Low bioaccessibility ranges were observed for Cr, Ni and Sb. Less than threequarters of the studies reported values below 20%, 30%, and 40% in the G phase and 30%, 20%, and 30% in the GI phase for Cr, Ni, and Sb respectively. The bioaccessibility ranges were usually larger for As, Cd, and Pb than for Cr, Ni, and Sb. The bioaccessibility tended to be higher in the G phase than in the GI phase for Cd, Ni, Pb, and Sb. Their solubility depends on pH and greatly increases in acidic environments (Sintorini et al., 2021) (e.g., stomach or simulated gastric phase). However, in the nearneutral pH and carbonate-rich environment of the intestinal phase (depending on the in vitro test used), PTEs may be stabilized in solution by complexation, re-adsorption on remaining particles or other insoluble constituents of chyme, and(or) precipitation as relatively insoluble compounds, making them less bioaccessible (Bagherifam et al., 2019; Cao et al., 2020; Grøn and Andersen, 2003). The distribution of As was similar in both phases. For Cr, in contrast to other PTEs, the bioaccessibility ranges reported in the literature appear slightly higher in the GI phase than in the G phase. As and Cr can be found in both anionic and cationic forms, indicating that these elements can behave differently in response to pH variations. A high pH can provoke the desorption of negatively charged species (anions) owing to a decrease in the positive charges of soil matrix compounds (De Miguel et al., 2012), or it may be associated with the formation of oxosoluble species at higher pH (Sialelli et al., 2011). Regarding the patterns, the differences between Ni and the other cationic elements (Cd and Pb) can be explained by their often geogenic origin, leading to a larger percentage of undissolved Ni in the G phase compared to Cd or Pb, which are mainly derived from anthropogenic sources (Ljung et al., 2007). Sb is similar to As, as both occur mainly as oxides, hydroxides, or oxo-anions and share the same major oxidation states (+III, +V) (Wilson et al., 2010), but their behavior in soils differs. The lower bioaccessibility values observed for some PTEs (particularly Cr, Ni, and Sb) suggest that further studies should consider their bioaccessibility and incorporate the data into HHRA; however, *in vivo* validations should first be established.



Figure 2. Bioaccessibility ranges of As, Cd, Cr, Ni, Pb, and Sb in gastric (G) and gastrointestinal (GI) phases according to their frequency of occurrence in the literature
1.1.3. Factors influencing oral bioaccessibility of PTEs

Soils are complex matrices whose constituents can interact with PTEs and modify their mobility and bioavailability. Measuring the total (or pseudototal) concentration of PTEs is insufficient for estimating the associated risk. It is necessary to consider bioavailability through bioaccessibility to account for the influence of the soil matrix. This review identified the most important influencing factors, including the source of contamination, physicochemical soil properties, chemical form (i.e., speciation), and solid phase distribution of the element in question.

1.1.3.1. Influence of the source of PTEs in soils

PTE environmental concentrations are related to natural phenomena such as weathering, biological activity, volcanic activity, and anthropogenic inputs such as agriculture, industry, mining, and urban sources. However, their bioaccessibility tends to be much lower when their origin in soils is geogenic compared with recent anthropogenic contamination (Bagherifam et al., 2019; Barsby et al., 2012; Morman et al., 2009; Madrid et al., 2008; Wang et al., 2020). In the case of geogenic contamination, PTEs tend to be sequestered over time, mainly through maturation processes, such as adsorption and trapping in soil micropores and organic matter (Diquattro et al., 2021; Fendorf et al., 2004; Stewart et al., 2003b). PTEs such as Cr, Ni, and Sb are often incorporated into the crystal lattice (i.e., assessed in the residual fraction by chemical sequential extractions), explaining their low bioaccessibility (Chu et al., 2022; Ding et al., 2022; Wang et al., 2023b). The correlation between the total concentration of a PTE and its bioaccessibility may reflect a common source of contamination (Barsby et al., 2012; Darko et al., 2019).

PTEs derived from anthropogenic sources are generally more soluble in the gastrointestinal environment than naturally occurring PTEs (Ljung et al., 2007). However, with anthropogenic contamination, bioaccessibility can vary depending on the source. For example, a meta-analysis by Kierulf et al., (2022) highlighted a higher gastric bioaccessibility of As in industrial soils than mining and rural soils and a high gastric bioaccessibility of Cd in agricultural soils. In contrast, the bioaccessibility of Cr in the gastric phase was higher than that in both industrial and urban soils. If the origin of contamination is known (geogenic or anthropogenic), it can be an indicator to get an initial idea of PTE bioaccessibility. However, predicting bioaccessibility becomes more complex when the contamination origin of PTEs is both geogenic and anthropogenic or only anthropogenic.

19

1.1.3.2. Influence of soil properties

The bioaccessibility of soil-bound PTEs depends on soil properties and contaminants. The influence of these different parameters on the bioaccessibility of PTEs is shown in Table 4, with total PTE concentration, pH, CEC, organic matter (OM), oxides, carbonates, and phosphate content, and granulometry. This table summarizes studies that have shown significant (positive or negative) correlations between the bioaccessibility of PTE and a given parameter. Studies that showed no significant influence of a parameter on bioaccessibility were also included. This table presents soil parameters and bioaccessibility correlations, expressed in mg kg⁻¹ or percentage. The results of statistical analyses of bioaccessibility in both units are not always consistent (Cox et al., 2013; Liu et al., 2016). The correlations obtained with percentage bioaccessibility were included for clarity in this case. When significance test information was unavailable, the influence was considered if the correlation coefficient was higher than 0.5 (Pearson R² or Spearman Rho >0.5). When several soil fractions were tested, the fraction <250 μ m recommended by most tests was used. Correlations were also read graphically (if the principal component analysis was used) when no other information was available but only when the correlations were excellent. Each reference has been numbered to facilitate the understanding of the table, and Table 5 presents each study in more detail, including its location, context, number of soils, and in vitro assay used.

Soil pH

The pH of the soil solution controls many reactions in the soil, such as solubilization/precipitation, adsorption/desorption on the soil matrix, or speciation in the soil solution and can influence the surface charges of soil particles. The pH of the soil solution is linked to the soil pH and its compounds. Soil pH is one of the significant parameters controlling the availability of PTEs directly or indirectly by influencing other soil properties (e.g., the charge of Al and Fe oxides and the exchange capacity of clays) and has a direct effect on absorption (Basta et al., 1993; Du et al., 2020; Lake et al., 2021). Soil pH is linked to the soil's redox potential (Eh), which controls the oxidation state of PTEs and subsequently affect their mobility and toxicity. Although Eh is a parameter governing the speciation of PTEs, only pH is measured by stakeholders because of the variation in Eh over time. Negative correlations between the soil pH and PTEs bioaccessibility were found in the literature for both phases (Table 4). Indeed, a low soil pH can lead to the desorption of PTEs from organic, clay, or other sorbent compounds (Rinklebe and Shaheen, 2017) and whereas an alkaline pH can promote substantial and(or) sometimes irreversible adsorption (Grøn and Andersen, 2003; Yang et al., 2006). Therefore, cationic PTEs may be less strongly adsorbed in acidic soils and are thus more bioaccessible because of their global positive charge. The behavior of PTEs that can be found in both anionic and cationic forms (As, Cr and Sb) in response to pH changes is more

complex, as they are found to change their affinities with soil matrix compounds. Studies have generally found positive correlations for Cr and As (Table 4), indicating that a lower soil pH leads to lower bioaccessibility, and vice versa. A neutral to basic soil pH, together with assumed high Eh value, can favor the appearance of soluble Cr (VI), whereas the opposite would enhance the appearance of less soluble Cr (III) (De Miguel et al., 2012; Wolf et al., 2007). In several studies, there was a consensus on the fact that there was a positive relationship between soil pH and the bioaccessibility of As, using UBM, PBET or USEPA Method 1340 (Lake et al., 2021). Furthermore, high soil pH can promote the desorption of negatively charged species owing to the higher number of negative sites on the surface of iron oxides (Das et al., 2013; Juhasz et al., 2009a). Conversely, acidification of the soil in the G phase can cause an increase in the adsorption of negatively charged PTE on iron oxides, decreasing the bioaccessibility in the same way (Xia et al., 2016).

		As							Cd				
		Gastric phase		Gas	tro-intestinal pl	nase		Gastric ph	ase		Gastro-intestina	al phase	
	Negative correlation	No significant correlation	Positive correlation	Negative correlation	No significant correlation	Positive correlation	Negative correlation	No significant correlation	Positive correlation	Negative correlation	No significant correlation	Positive correlation	
Soil matrix													
Total concentration	[9]	[19]	[1] [2] [3] [6] [7] [16] [21] [24]			[1] [2] [3] [7] [16] [21] [24] [31]	[22]	[9]	[2] [3] [4] [7] [14] [20] [21] [27]	[30]		[2] [3] [4] [7] [20] [21] [27]	
рН		[1] [12] [16] [19]	[6] [9] [15] [23] [35]		[1] [12] [16] [35]			[9] [12] [20] [22] [29] [35]	[23]	[30]	[12] [20] [29] [35]		
CEC		[15] [35]			[35]	[31]		[29] [35]		[29]	[35]		
OM content / TOC	[6] [11] [16] [35]	[1] [9] [12] [15]	[19] [23]	[16] [35]	[1] [12] [31]		[23]	[12] [20] [22] [29] [35]	[9] [30] [36]	[21] [35]	[12] [20] [29]		
Oxides Fe / Fe tot	[6] [12] [15] [16] [23]	[1] [9] [35] [19]		[12] [16] [35]	[1]		[9] [12] [22] [23]	[20] [29] [35]		[35]	[12] [20] [29]		
Oxides Mn / Mn tot	[1] [12] [16]	[1] [6] [19] [23] [35]		[1] [12] [16]	[1] [35]		[12] [22]	[29] [20] [23] [35]			[12] [20] [29] [35]		
Oxides Al / Al tot	[12] [16] [23] [15]	[35] [19] [1]	[9]	[12] [16] [35]	[1]		[12] [22]	[20] [35] [9] [23]		[35]	[12] [20]		
Oxides Mg / Mg tot Carbonates Phosphorus	[20] [20]	[16]	[12] [9]	[00]	[16]			[9] [20]	[12]		[20]	[12]	
Clay	[6] [11]	[12] [35]			[12] [35]		[20]	[12] [35]	[36]	[20] [30]	[12] [35]		
Silt	[15]	[12] [35]			[12] [35]			[12] [20] [35]			[12] [35] [20]		
Sand		[12] [35]	[11]		[12] [35]			[12] [20] [35]			[12] [35] [20]		
Solid phase distribution								[]			L - J		
Acid-exchangeable			[1] [18]			[1] [18]		[29]	[17] [29]		[17] [29]	[17]	
Reducible phase Oxidable phase Residual fraction	[18] [18]	[18]	[1] [1]	[18]	[18] [18]	[1] [1]	[29] [29]	[17] [17] [29]	[17] [17]	[29] [29]	[17] [17] [29]	[17]	

Table 4. Summary of PTE bioaccessibility studies addressing correlations with soil properties

Tabl	Table 4. (continued)											
			C	Cr					Ni			
		Gastric phase		Gast	ro-intestinal p	hase		Gastric phase		Gas	tro-intestinal ph	ase
	Negative correlation	No significant correlation	Positive correlation	Negative correlation	No significant correlation	Positive correlation	Negative correlation	No significant correlation	Positive correlation	Negative correlation	No significant correlation	Positive correlation
Soil matrix												
Total concentration		[4] [7] [9] [22] [33]	[2] [5] [38]		[4] [7]	[2] [5] [30]	[25] [22]	[2] [5] [7] [8] [9] [26] [33]	[4] [14]	[25]	[2] [7] [26]	[4] [5]
рН	[9] [38]	[5] [12] [13] [33]	[22] [23]	[30]	[5] [12]		[25] [36]	[5] [8] [9] [12] [13] [22] [23] [26] [32] [33]			[12] [26] [25]	[5]
CEC OM content / TOC	[36]	[13] [5] [12] [13] [22] [23]	[38] [9] [30] [33] [38] [36]		[12] [5]			[8] [5] [8] [12] [13] [22] [23] [33]	[13] [9] [25] [26] [32] [33] [36]	[5]	[12]	[25] [26]
Oxides Fe / Fe tot	[22] [23]	[9] [12] [13]	[5]		[12]	[5]	[9] [13] [22] [23] [25]	[5] [8] [12]	[32]	[25]	[5] [12]	
Oxides Mn / Mn tot	[22] [23]	[12]	[5]		[12]	[5]	[25]	[5] [12] [22] [23]		[25]	[5] [12]	
Oxides Al / Al tot	[22] [23]	[9] [12]	[5]		[12]	[5]	[9] [22] [25] [23]	[5] [12]		[25]	[12]	[5]
Oxides Mg / Mg tot		[13]	[5]			[5]	[25]	[5] [13]		[25]		[5]
Carbonates Phosphorus Clay Silt Sand		[12] [5] [9] [33] [12] [12] [12]	[5]	[30]	[12] [5] [12] [12] [12]	[5]	[5] [26] [26]	[12] [5] [25] [9] [12] [33] [12] [12]	[32] [26]	[5] [26]	[12] [5] [25] [12] [12] [12]	[26] [26]
Solid phase distribution												
Acid- exchangeable phase		[33]						[33]	[8] [33]			
Reducible phase		[33]							[8] [33]			
Oxidable phase		[33]	[13]				[33]	[33]	[8] [13]			
Residual fraction	[38]	[33]					[8]	[33]				

				Sb								
		Gastric phase		Gast	tro-intestinal pl	hase	Gas	tro-intestinal pl	hase	Gast	ro-intestinal pl	hase
	Negative correlation	No significant correlation	Positive correlation	Negative correlation	No significant correlation	Positive correlation	Negative correlation	No significant correlation	Positive correlation	Negative correlation	No significant correlation	Positive correlation
Soil matrix												
Total concentration		[22] [28] [37] [38]	[2] [3] [4] [7] [9] [14] [20] [21] [27] [26]		[31]	[2] [3] [4] [7] [10] [20] [21] [26] [27] [30]			[16] [24] [34]			[16] [24]
рН	[9]	[12] [15] [20] [22] [23] [26] [37] [38]	[28]		[12] [20] [26]			[12] [16] [34]			[12] [16]	
CEC	[28] [15]	[38]	[37]		[31]	[10]	[28]					
OM content / TOC	[28]	[12] [15] [20] [22] [23] [37] [38]	[9] [26]	[10]	[12] [20] [30] [31]	[26]	[16]	[12]	[34]	[16]	[12]	
Oxides Fe / Fe tot	[9] [12] [15] [28]	[20] [22] [23]			[12] [20]		[16] [28]	[12] [34]		[16]	[12]	
Oxides Mn / Mn		[12] [20] [22] [23]			[12] [20]		[16]	[12] [34]		[16]	[12]	
Oxides AI / AI tot Oxides Mg / Mg	[9] [15]	[12] [20] [22] [23]			[12] [20]		[16]	[12]		[16]	[12]	
Carbonates Phosphorus		[12] [20] [9]			[12] [20]	[10]		[12] [16]			[12] [16]	
Clay	[15] [20] [26]	[12] [37]		[10] [26]	[12] [20]			[12] [34]			[12]	
Silt Sand	[26]	[12] [20] [37] [12] [20] [37]	[26]	[26]	[12] [20] [12] [20]	[26] [30]	[34]	[12] [12]	[34]		[12] [12]	
Solid phase distribution												
Acid- exchangeable phase		[18]	[10]		[18]							
Reducible phase Oxidable phase	[18] [10] [18]		[10]	[18]		[18]						
Residual fraction	[38]	[18]		[18]								

Table 4. (continued)

Numbers from [1] to [38] correspond to studies from literature listed in Table 5

Table 5. List of studies cited in Table 4

Study	Reference	Location	Context	Number of soils	<i>In vitro</i> test
1	Bari et al., (2021)	Australia	Abandoned mine locations	7	SBRC / PBET
2	Barsby et al., (2012)	Irland	Rural and urban soils	91	UBM
3	Boisa et al., (2013)	Kosovo	Mining and smelting area	128	UBM
4	Chu et al., (2022)	China	Nonferrous smelting area	32	PBET
5	Cox et al., (2013)	Irland	Overlying Palaeogene basalt lavas	12	UBM
6	Das et al., (2013)	India	As-enriched soil	7	SBET
7	Ding et al., (2014)	China	Urban soils	43	PBET
8	Ding et al., (2022)	China	Natural soils containing serpentine minerals and anthropogenically contaminated soils	48	SBRC
9	Dodd et al., (2017)	Canada	Background soils	532	Method 1340
10	Finžgar et al. <i>,</i> (2007)	Slovenia	Mining and smelting area	18	PBET
11	Girouard et Zagury (2009)	Canada	Chromated copper arsenate contaminated soils	20	IVG
12	Hiller et al. <i>,</i> (2022)	Slovakia	Urban garden	33	PBET
13	Kelepertzis and Stathopoulou (2013)	Greece	Non anthropogenic contamination	15	PBET
14	Laha et al., (2020)	India	Playgrounds	16	SBET
15	Lake et al., (2021)	-	-	19	Method 1340
16	Li et al., (2014)	China	Mining area	29	SBET / PBET
17	Li et al., (2022)	-	-	12	UBM/SBRC/IV G/PBET
18	Liang et al. <i>,</i> (2016)	China	Spiked soils	3	PBET
19	Liu et al., (2016)	China	Rural and urban soils	80	SBET
20	Liu et al., (2018)	China	Mining soils	33	PBET
21	Louzon et al., (2020)	France	Urban, industrial, agricultural, soils	30	UBM
22	Ma et al., (2019)	China	Urban school/kindergarten soil	3	SBET
23	Ma et al., (2020)	China	Schools or kindergartens urban and rural areas	58	SBET
24	Ning et al., (2021)	China	Farming area / mining and smelting area	29	SBET
25	Palmer et al., (2013)	Ireland	Bedrock soils	91	UBM
26	Poggio et al., (2009)	Italy	Agricultural and residential soils	66	PBET
27	Roussel et al., (2010)	France	Urban soils	27	UBM
28	Sanderson et al., (2012)	Australia	Shooting range soils	4	SBET
29	Tang et al., (2006)	China	Unpolluted soils	5	PBET
30	Tian et al., (2020)	China	Urban soils	124	PBET
31	Van der Kallen et al., (2020)	Canada	Chromated copper arsenate contaminated soils	10	IVG

32	Vasiluk et al., (2019)	Canada	Ultramafic soils	8	SBRC
33	Wang et al., (2020)	Taiwan	Natural soils containing serpentine minerals and anthropogenically contaminated soils from farmlands	27	Method 1340
34	Wang et al. <i>,</i> (2023b)	China	Farmland soil	269	SBRC
35	Xia et al., (2016)	Australia	-	7	UBM
36	Xia et al., (2022)	China	Industrial sites	27	PBET
37	Yan et al., (2019)	Australia	Mining, shooting ranges, smelting soils	31	RBALP
38	Yang et al., (2018)	China	Urban soils	12	PBET

Soil organic matter

Soil organic matter (OM) content varies widely among soils. OM includes non-humic (i.e., unaltered biochemicals that have not been degraded though production by living organisms) and humic compounds (i.e., formed by secondary synthesis reactions involving microorganisms). Dissolved organic carbon (DOC) is the fraction of organic carbon dissolved in soil water or extracted from soil samples. DOC is an essential component of soil OM and can affect the mobilization of PTEs (Kalbitz and Wennrich, 1998). Soil OM can act as a negatively charged surface, depending on the pH of the soil solution. OM contains functional groups such as carboxyl, phenolic, enolic and alcoholic groups (Zhou and Haynes, 2010), which can ionize and become negatively charged under certain pH conditions. Negative charges on soil OM particles allow them to attract and retain positively charged ions, including PTE. The soil OM's functional groups can form covalent bonds with cationic PTEs, leading to the immobilization or reduced mobility of these elements in the soil. Moreover, OM (as well as some clays and oxides) has a variable charge depending on the pH of the soil solution, explicitly referring to the point of zero charges (PZC). At pH values below the PZC, the surfaces of the particles became positively charged, whereas, at pH values above the PZC, the surfaces became negatively charged. This charge variability may affect the interactions between soil components, including the adsorption and desorption of ions, as well as the overall chemical properties of the soil. Thus, the mechanisms that control the bioaccessibility of PTEs in the presence of soil OM and DOC are complex and simultaneous involve (i) the adsorption and complexation of cations on negatively charged sites (ion exchange), (ii) the mobility of some PTEs ions from adsorption through the formation of low molecular weight chelates, and (iii) the retention of many higher molecular weight contaminants in the solid forms of humus (Selinus et al., 2013; Zhou and Haynes, 2010). Soil OM can reduce the bioaccessibility of metals by immobilizing them in the soil matrix, making them less available. Covalent bonding between functional groups on soil OM and metal ions can form stable complexes, reducing their mobility and bioaccessibility. The binding of PTEs to soil OM and DOC sequesters them in OM aggregates or humic substances. This sequestration process limits the bioavailability of PTEs. Moreover, the pH-dependent charge of the soil OM can influence the

bioaccessibility of PTEs. At low pH values, the positively charged surfaces of soil particles and OM may enhance metal adsorption and reduce bioaccessibility. Conversely, negatively charged surfaces can repel metals at higher pH values, potentially increasing their bioaccessibility. The literature shows that OM can decrease or increase the bioaccessibility of PTEs in soils (Table 4). For example, Cai et al., (2016) found that the bioaccessibility of Pb decreased with increasing OM content because of its high affinity for each other. In some cases, the retention mechanisms may be weaker, inducing easier release by digestive fluids. De Miguel et al., (2012) found that polar groups of OM probably fixed the small bioaccessible fraction of Cr. Therefore, the influence of OM may depend on the affinity and intensity of the retention mechanisms between the OM and PTEs.

Mineral constituents

The inorganic constituents of soils typically constitute most of the soil mass. The interaction between PTEs and the surfaces of these compounds is a critical process that governs their bioaccessibility. The mineralogical properties that affect the bioaccessibility of PTEs include encapsulation in insoluble matrices; formation of insoluble alteration or precipitation rinds; and formation of iron oxide, PTE oxide, and PTE phosphate cement, which reduce the surface area available for dissolution (Davis et al., 1996). Oxides of iron, manganese, aluminum, clays, carbonates, and phosphates have been identified as having the most significant influence on the bioaccessibility of PTEs. All these constituents affect the cation exchange capacity (CEC), a correlation parameter reported in the literature. Fe, Mn, and Al are often referred to as hydrous oxides, and similar to clays, they are mainly derived from the weathering reactions of rock minerals. These minerals have vast reactive surface areas and similar modes of action to bind contaminants, including cation and anion exchange and specific adsorption. PTEs are electrostatically bound to clay or oxide surface sites with opposite cation- and anion-exchange charges. As mentioned previously, OM can also act as an ion exchanger. CEC represents the ability of the soil to attract and retain cations, and it mainly measures the number of sorption sites available on the soil matrix compounds (Finžgar et al., 2007). However, the literature indicates that the influence of CEC can be both positive and negative (seeTable 4). An increase in bioaccessibility related to an increase in CEC can occur, because a higher CEC can improve the solubility of PTEs in an exchangeable form in the soil (Kelepertzis and Stathopoulou, 2013; Yan et al., 2019). The bioaccessibility of cationic and anionic PTEs may be less affected by CEC.

Specific adsorption involves the exchange of cations and anions with surface ligands on solids to form partially covalent bonds with lattice ions. As with cation and anion exchange, specific adsorption highly depends on pH, charge, and ionic radius. However, this binding mechanism is much stronger. Several studies have confirmed the importance of oxides in the bioaccessibility of contaminants, which play a critical role in controlling soil chemical reactions and may retain significant quantities of PTEs in the

27

soils. Moreover, soil pH and Eh determine the soil's distribution of Fe and Mn oxide fractions (Bagherifam et al., 2019). Similar to OM, the surface charge of oxides can vary with pH. The surface has a net positive charge at pH values lower than the PZC (Zhou and Haynes, 2010). Overall, the literature shows that the presence of oxides or total Fe, Al, Mn, and Mg reduces the bioaccessibility of all PTEs (Table 4). Associations (adsorption and coprecipitation) with oxides tend to be relatively stable and, therefore, more resistant to dissolution by digestive fluids (Diquattro et al., 2021; Lake et al., 2021; Li et al., 2014; Niyommaneerat and Aung, 2010; Rinklebe and Shaheen, 2017). In some cases, the bioaccessibilities of PTEs and oxide compounds were positively correlated. One explanation may be that weathering transforms primary iron oxides into secondary oxides over time, and PTEs tend to be more bioaccessible (Cox et al., 2017). Although geogenic PTEs are often not bioaccessible because of sequestration mechanisms, mineral weathering can increase their bioaccessibility over time (Fendorf et al., 2004).

The effect of phosphorus (P) on bioaccessibility has received little attention in the literature, although some studies have highlighted the relationships between the two; for Cr and As, phosphorus appeared to be positively correlated with gastric bioaccessibility, whereas for Ni and Pb, the opposite was observed (Table 4). Soluble phosphorus is often associated with As mobilization, as both can be found in anionic species. The addition of P has been shown to increase As bioaccessibility (Basta et al., 2007; Basta and Juhasz, 2014) because of the similarity between P and As, which makes it possible for P to desorb As from the soil (Li et al., 2017). Phosphorus is an essential component of soil when considering As chemistry. In contrast, Pb bioaccessibility decreased when phosphorus was added to Pb-contaminated soils due to the formation of Pb–P minerals during the acidic gastric *in vitro* test phase (Li et al., 2017; Tian et al., 2020). The effect of soluble phosphorus can vary between elements with cationic and anionic behavior.

Clay, sand, and silt contents also appeared to influence the bioaccessibility of PTEs. Similarities were found for some elements, where the clay content and bioaccessibility of As, Cd, Cr, Ni, and Pb were generally negatively correlated, and the sand content and bioaccessibility of As, Ni, Pb, and Sb were positively correlated (Table 4). The uptake of PTEs by clay minerals in soils may limit their mobility through stronger bonds (Tian et al., 2020). In contrast, the association with sand content induced weaker associations, making the elements more bioaccessible. The literature review highlights the critical influence of inorganic compounds, which can resist the dissolution of digestive fluids through strong retention mechanisms (oxides and clays).

PTEs associated with carbonates are generally relatively bioaccessible because of the acidic pH of the gastric phase. Cox et al., (2013) found that bioaccessible Ni is often present in carbonates and that Cr is only weakly bound to carbonates. PTEs contained in carbonates are quickly released in the acidic gastric phase, which could partly explain the lower bioaccessibility of Cr than that of Ni. However, the total

amount of carbonates is not always sufficient to understand bioaccessibility because, some elements may have variable affinities depending on chemical speciation. Denys et al., (2008) found no association between Sb and carbonates. This may be due to the prevalence of Sb (V), which has a lower affinity for carbonates than Sb (III).

Solid phase distribution and chemical form

The adsorption of contaminants onto different solid phases is a key factor determining the bioaccessibility of PTEs. Several analytical methodologies are available for measuring the physical and chemical forms of soil PTEs. Spectroscopic methods, such as X-ray diffraction (XRD) and scanning electron microscopy (SEM), are used to characterize the mineralogy of soil and possibly specify the distribution of PTEs in these minerals (MonneronGyurits et al., 2022). A relatively simple and welladopted method to assess phases, including PTEs, is chemical sequential extractions with reagents of increasing dissolution strength. Each reagent targets a specific solid phase associated with the PTE. The residual fraction often comprises primary and secondary silicates (Cornu and Clozel, 2000) and is less bioaccessible. Several studies have shown that low bioaccessibility is often coupled with a high fraction of PTEs carried by the residual phase, particularly Ni, Cr, and Sb, and(or) those of geogenic origin (Denys et al., 2008; Ding et al., 2022; Poggio et al., 2009). In contrast, PTEs with higher bioaccessibility (As, Cd, and Pb) are often bound to exchangeable, carbonate, or amorphous Fe/Al hydroxides fractions rather than to the residual fraction (Bari et al., 2021; Li et al., 2015b; Li et al., 2022). Therefore, chemical sequential extraction is an exciting tool for understanding bioaccessibility (Table 4). In addition to the solid phase distribution of PTEs, their chemical form (i.e., speciation) can affect their bioaccessibility and toxicity. Some PTEs have different toxic effects depending redox states (As, Cr, and Sb). Given the potential risks associated with chemical speciation, it is crucial to understand the redox states better. Some authors have investigated whether the speciation of these redox-sensitive PTEs changes during the human gastrointestinal digestion of soils. In a study conducted by Denys et al., (2008) on Sb bioaccessibility in four soil samples collected from a former Pb mining site, the results showed that for each soil, the pentavalent form was present, and no change in speciation occurred during the digestion process. However, Wolf et al., (2007), Broadway et al., (2010), and Yu et al., (2012) observed a reduction in Cr (VI) to Cr (III) in digestive fluids, which was a consequence of both low pH in the gastric phase and the contribution of OM from the soil samples (Bulgariu et al., 2008; Jardine et al., 2013; Pettine and Capri, 2005). Ruby et al., (1999) illustrated the effects of chemical composition (in particular, As and Pb species and morphologies) on PTE bioavailability and bioaccessibility. Mineral phases such as lead sulfate or iron-lead sulfate, which form under acidic conditions, are more stable and hence less bioaccessible in the acidic gastric compartment. In contrast, mineral phases such as lead carbonate or

lead oxide, which form under alkaline conditions, are less stable and hence more bioaccessible in the stomach. Phosphate minerals have highly variable compositions and a wide range of bioaccessibility values. Pb may also be bound to carboxyl and sulfhydryl ligands on OM, sorbed to the clay and mineral surfaces of Fe, Al or Mn oxides, dissolved, and complexed with ionic species. Depending how Pb is bound or complexed, these species may have a different bioaccessibility (Ruby et al., 1999). As is substantially different from Pb, it occurs in natural environments in valence states: As(III) and As(V). In soils, As may be present in an anthropogenic form in which it was deposited (e.g., lead and calcium arsenates, arsenic pentoxide, and arsenic disulfide), or as various soil alteration phases of variable composition, such as arsenic in iron and manganese oxides and in phosphate minerals. It commonly co-occurs with Pb during several phases of soil alteration. Studies have shown that soil arsenic phases, such as arsenic sulfides or arsenopyrite, have lower relative bioavailability than iron-arsenic oxides, manganese-arsenic oxides, or lead-arsenic oxides (Ruby et al., 1999; Meunier et al., 2010; Stevens et al., 2018). Toujaguez et al., (2013) reported that the main factors influencing As bioaccessibility were the frequent occurrence of amorphous Fe arsenate and Fe oxyhydroxides and the stability of mineral phases in the gastrointestinal compartment. The influence of solid phase speciation in soil on the bioaccessibility and bioavailability of As and Sb was studied in details by Bagherifam et al., (2019).

Statistical modeling of bioaccessibility

The study of the parameters that influence the bioaccessibility of PTEs has made it possible to highlight some of the most critical factors. Soils are complex matrices in which each parameter can potentially affect the others. Several studies have performed multiple regression analyses to predict the oral bioaccessibility of PTEs based on soil properties (Table 6). Similarities in soil properties may be a prerequisite for creating a standard predictive model (Zhu et al., 2016). Occasionally, the soil type has been found to increase the explained variance in soil properties (Du et al., 2020). It should be noted that different statistical approaches and assumptions have been used to develop these models. However, in general, the most common soil predictors of PTE bioaccessibility are a combination of the total concentration of PTEs, soil pH, soil texture (clay, sand, and silt), and(or) the contents of Fe and AI (total and oxides), OM, and organic carbon. For example, a simple regression of As bioaccessibility vs. log (FeOx + AlOx), including soil pH and the percentage of clay, can significantly improve the regression (Lake et al., 2021). Similarly, the inclusion of clay in combination with Fe and Al oxides resulted in a better explanation of the variability in Pb bioaccessibility (Lake et al., 2021). These results show that the prediction of PTE bioaccessibility resulted from a multitude of site-dependent influencing parameters (soil use, origin, or source of contamination).

PTE	Context	N	In vitro test	Phase	Log BAc	Equation	R ²	Reference
As	Railway corridors, dip and mine sites	50	SBET	G	-	0.409 As - 4.579 Fe + 67.85	0.96	Juhasz et al., (2007a)
As	Railway corridors	18	SBET	G	-	0.498 As - 3.764 Fe - 31.86	0.9	Juhasz et al., (2007a)
As	Dip sites	13	SBET	G	-	0.358 As - 9.803 Fe + 131.91	0.7	Juhasz et al., (2007a)
As	Mine sites	8	SBET	G	-	0.762 As - 20.544 Fe + 72.877	0.98	Juhasz et al., (2007a)
As	-	19	Method 1340	G	-	29 + 12.9 pH - 0.402 clay - 38.9 log (Fe oxide + Al oxide)	0.85	Lake et al., (2021)
As	-	19	Method 1340	G	-	-1.66 + 12 pH - 0.145 clay - 1.3 Al oxide	0.90	Lake et al., (2021)
As	-	19	Method 1340	G	-	97.1 - 25.5 log (Fe oxide + Al oxide)	0.69	Lake et al., (2021)
As	Urban, industrial, agricultural soils	30	UBM	GI	-	-2.06 + 0.905As + 0.644 silt	0.72	Louzon et al., (2020)
As	Urban, industrial, agricultural soils	30	UBM	G	-	-2.09 + As + 0.623 silt	0.71	Louzon et al., (2020)
As	Urban, industrial, agricultural soils	30	UBM	G	-	-0.422 + 0.952 As	0.65	Louzon et al., (2020)
As	Urban, industrial, agricultural soils	30	UBM	GI	-	-0.337 + 0.851As	0.63	Louzon et al., (2020)
As	Urban soils	25	IVG	G	-	2.78 pH + 0.07 OM - 11.74	0.45	Lu et al., (2011)
As	Urban soils	25	IVG	GI	-	2.64 + 0.027 OM - 0.13 silt - 0.097	0.6	Lu et al., (2011)
As	Former dipping vat sites	12	IVG	G	-	250.9 + 0.15 P - 3.36 clay - 40.5 pH - 0.34 CEC + 0.66 Ca+Mg	0.85	Sarkar et al., (2007)
As	Former dipping vat sites	12	IVG	GI	-	- 11 + 0.14 P - 1.57 clay - 0.15 CEC + 0.044 Ca+Mg	0.86	Sarkar et al., (2007)
As	Spiked soils	22	PBET	GI	-	10.1 pH + 13.1 TIC - 32.7 log Fe	0.81	Yang et al., (2002)
As	Spiked soils	36	PBET	GI	-	11.3 pH - 30.5 log Fe	0.74	Yang et al., (2002)
As	Mining area	76	SBET	G	-	-1.907 + 0.896 log As + 0.13 pH	0.44	Zhu et al., (2016)
Cd	Mining soils	33	PBET	G	Log	- 0.226 + 0.35 log TOC - 0.20 log Mn + 1.18 log Cd	0.93	Liu et al., (2018)
Cd	Mining soils	33	PBET	GI	Log	0.33 - 0.27 log Mn + 0.98 log Cd	0.77	Liu et al., (2018)
Cd	Urban, industrial, agricultural soils	30	UBM	G	-	-0.054 + 0.996 Cd	0.99	Louzon et al., (2020)
Cd	Urban, industrial, agricultural soils	30	UBM	GI	-	-0.144 + 0.833 Cd	0.95	Louzon et al., (2020)
Cd	Urban, industrial, agricultural soils	30	UBM	GI	-	0.160 + 0.893 Cd + 0.193 OM	0.96	Louzon et al., (2020)
Cd	Coal mining area	36	UBM	G	-	-0.96 + 0.0025 sand + 2.33 Al oxide + 0.61 Cd	0.83	Pelfrêne et al., (2011)
Cd	Coal mining area	36	UBM	GI	-	0.98 + 0.0013 sand - 0.0051 OM + 0.24 Cd	0.72	Pelfrêne et al. <i>,</i> (2011)
Cd	Coal mining area	280	UBM	G	-	-0.053 + 0.012 Al +0.75 Cd	0.90	Pelfrêne et al., (2012)

Table 6. Overview of predictive models of PTE bioaccessibility in the gastric (G) and gastrointestinal (GI) phases from soil properties

Cd	Coal mining area	280	UBM	GI	-	$0.56 - 0.0024 \text{ CaCO}_3 + 0.035 \text{ Fe oxide} + 0.24 \text{ Cd}$	0.46	Pelfrêne et al., (2012)
Cd	Urban/Industrial/Rural/Mining	223	SBET	G	-	-0.07 + 1.1 log Cd NHO ₃	0.92	Rodrigues et al., (2013)
Cd	Coal mining area	27	UBM	G	-	1.23 - 2.25 Fe + 0.79 Cd – 0.00102 Pb	0.98	Roussel et al., (2010)
Cd	Coal mining area	27	UBM	GI	-	0.68 - 0.55 N + 0.39 Cd	0.87	Roussel et al., (2010)
Cd	Vegetable plots	6	PBET	GI	Log	- 1.345 - 0.209 logCd + 2.321 logP	0.88	Tian et al., (2020)
Cd	Industrial	26	PBET	GI	Log	2.062 + 0.011log Cd - 0.080 pH + 0.265 log OM	0.41	Tian et al., (2020)
Cd	Roadside area	25	PBET	GI	Log	1.396 - 0.363 log Cd	0.28	Tian et al., (2020)
Cr	Urban soils	3	SBET	GI		5.15 Cr red + 0.0818 Cr ox + 18.01	0.97	Jorge Mendoza et al., (2017)
Cr	non anthropogenic contamination	15	PBET	G		- 36.8 + 1.79 Cr AOx + 4.9 pH	0.80	Kelepertzis and Stathopoulou (2013)
Cr	Roadside area	25	PBET	GI	Log	2.283 -1.121 log Cr + 0.651 log N - 0.264 log P	0.81	Tian et al., (2020)
Cr	Solid waste landfill	9	PBET	GI	Log	- 0.006 - 0.069 log Cr - 0.005 clay + 0.253 pH	0.89	Tian et al., (2020)
Cr	Vegetable plots	6	PBET	GI	Log	- 0.236 - 2.337 log Cr + 2.033 log OM + 3.065 log P	0.99	Tian et al., (2020)
Cr	Industrial	28	PBET	GI	Log	1.589 - 0.792 log Cr + 0.819 log OM - 0.002 clay	0.49	Tian et al., (2020)
Cr	Industrial	25	PBET	GI	Log	1.085 - 0.060 log Cr – 0.003clay	0.15	Tian et al., (2020)
Cr	Industrial	26	PBET	GI	Log	1.211 + 0.239 log Cr + 1.304 log OM - 1.332 log K	0.3	Tian et al., (2020)
Cr (III)	-	35	PBET	G	-	16.02 + 0.426 clay - 9.56 TIC	0.72	Stewart et al., (2003a)
Cr (III)	-	35	PBET	G	-	15.54 + 0.408 clay - 3.78 TOC	0.67	Stewart et al., (2003a)
Ni	Urban soils	3	SBET	G	-	-0.425 CEC + 0.953 Ni - 6.679	0.93	Jorge Mendoza et al., (2017)
Ni	non anthropogenic contamination	15	PBET	G	-	53.7 + 8.42 TOC + 0.0326 Ni - 6.18 Ca	0.86	Kelepertzis and Stathopoulou (2013)
Ni	Agricultural and residential sites	56	PBET	G	-	0.58 pH + 0.41 OM + 0.01 sand + 0.02 clay + 0.03 Ni - 1.6	0.22	Poggio et al., (2009)
Ni	Agricultural and residential sites	56	PBET	GI	-	0.38 pH + 0.21 OM – 0.01 sand + 0.01 Ni + 9.8	0.33	Poggio et al., (2009)
Pb	Urban soils	144	UBM	-	-	- 34 + 0.695 Pb	0.96	Appleton et al., (2012)
Pb	Mining soils	15	UBM	G	-	-18.9 CEC + 1.14 Mn - 2.82 Fe - 3.6 OM	0.81	Caboche et al., (2010)
Pb	Smelting soils	10	UBM	G	-	-2.2 clay + 4.9 P + 4.6 Mn	0.73	Caboche et al., (2010)
Pb	Mining and smelting soils	25	UBM	G	-	-7.7 clay + 21.1 Mn	0.58	Caboche et al., (2010)

Pb	Community gardens and urban farms	20	PBET	G	-	47.8 - 2.78 OM	0.53	Cai et al., (2016)
Pb	Community gardens and urban farms	20	PBET	GI	-	17.6 - 0.994 OM	0.52	Cai et al., (2016)
Pb	Urban soils	10	SBET	G	-	-107 + 0.327 Pb + 13.6 pH	0.99	Dehghani et al., (2018)
Pb	Farming and mining soils	78	PBET	G	-	27.87 + 0.01 Pb + 0.77 Clay	0.25	Du et al., (2020)
Pb	Farming and mining soils	78	PBET	GI	-	-2.05 + 1.62 pH – 0.002 Pb + 0.16 Pb G	0.28	Du et al., (2020)
Pb	Urban soils	3	SBET	G	-	0.409 CEC + 2.98 Pb red + 0.935 Pb ox - 2.26	0.99	Jorge Mendoza et al., (2017)
Pb	Urban soils	45	SBET	G	-	1.75 + 0.769 Pb + 0.394 Ca	0.81	Kelepertzis et al., (2015)
Pb	-	19	Method 1340	G	-	103.8 – 0;245 clay – 11.9 log (Fe oxide + Al oxide)	0.686	Lake et al., (2021)
Pb	Mining soils	33	PBET	G	Log	1.74 - 1.07 log Fe - 1.12 log pH - 0.30 log silt + 1.23 log Pb	0.91	Liu et al., (2018)
Pb	Mining soils	33	PBET	GI	Log	- 0.53 + 0.79 log Pb	0.37	Liu et al., (2018)
Pb	Urban, industrial, agricultural soils	30	UBM	G	-	-0.350 + 1.07 Pb	0.95	Louzon et al., (2020)
Pb	Urban, industrial, agricultural soils	30	UBM	GI	-	-1.68 + 1.18 Pb	0.75	Louzon et al., (2020)
Pb	Coal mining area	36	UBM	G	-	56.6 - 0.5 CaCO ₃ - 101.7 Al oxide + 0.64 Pb	0.82	Pelfrêne et al., (2011)
Pb	Coal mining area	36	UBM	GI	-	60.4 - 3.95 Fe + 25.1 Cd - 0.14 Zn	0.64	Pelfrêne et al., (2011)
Pb	Coal mining area	280	UBM	G	-	6.06 - 0.25 CaCO ₃ - 0.42 OM + 16.08 P ₂ O ₅ - 0.88 Al + 0.67 Pb	0.9	Pelfrêne et al., (2012)
Pb	Coal mining area	280	UBM	GI	-	- 5.12 + 17.07 P ₂ O ₅ + 0.19 Pb	0.65	Pelfrêne et al., (2012)
Pb	Agricultural and residential sites	56	PBET	G	-	- 1.5 OM - 1.1 clay + 0.31 Pb + 12.7	0.53	Poggio et al., (2009)
Pb	Agricultural and residential sites	56	PBET	GI	-	0.51 pH + 0.35 OM + 0.03 sand + 0.02 Pb - 3.9	0.49	Poggio et al., (2009)
Pb	Urban/Industrial/Rural/Mining	223	SBET	G	-	$-0.18 + \log Pb HNO_3 - 0.08 \log TOC + 0.02 pH$	0.99	Rodrigues et al., (2013)
Pb	Coal mining area	27	UBM	G	-	171.7 - 1.09 CaCO ₃ - 225.9 Fe + 0.68 Pb	0.97	Roussel et al., (2010)
Pb	Coal mining area	27	UBM	GI	-	1020.6 - 32.6 N - 131.1 pH + 0.39 Pb	0.95	Roussel et al., (2010)
Pb	Urban green land	5	PBET	GI	Log	2.232 - 0.098 log Pb - 0.962 log P	0.9	Tian et al., (2020)
Pb	Industrial	28	PBET	GI	Log	- 0.075 + 0.632 log Pb	0.42	Tian et al., (2020)
Pb	Mining area	76	SBET	G	-	-2.675 + 0.969 log Pb + 0.567 log silt + 0.903 log sand	0.87	Zhu et al., (2016)
Pb	Playground	27	SBET	G	-	0.312 + 0.472 log Pb + 0.486 log OM - 0.157 log clay	0.93	Zhu et al., (2016)

As, Cd, Pb, Ni, Cr, Ca, Fe, Mn, Zn: total or pseudototal concentrations; OM: soil organic matter; P or P₂O₅: available phosphorus; CEC: cationic exchange capacity; Ca+Mg: calcium and magnesium content; TIC: total inorganic carbon; TOC: total organic carbon; CaCO₃ : total carbonates; Cd HNO₃ or Pb HNO₃: extractable concentrations by nitric

acid; Cr red or Pb red: chromium or lead bound to reducible fraction; Cr ox or Pb ox: chromium or lead bound to oxidable fraction; N: nitrogen ; Cr AOx : extractable ammonium oxalate (NH₄)₂C₂O₄ chromium

1.1.4. Use of bioaccessibility in human health risk assessment

For the soil ingestion pathway and chronic exposure, human intake is calculated as follows (US EPA, 1989):

$$ADI = \frac{C \times IngR \times EF \times ED}{BW \times AT} \times 10^{-6}$$

Where *ADI* is the average daily intake (mg PTE kg⁻¹ bw day⁻¹); *C* is the total concentration of PTE in soil (mg kg⁻¹); *IngR* is the ingestion rate of soil (mg day⁻¹); *EF* is the exposure frequency (days year⁻¹); *ED* is the exposure duration (years); 10^{-6} corresponds to the conversion factor (kg mg⁻¹); *BW* is the body weight (kg); and *AT* is the averaging time (days) equal to *ED* x 365 for threshold effects of the substances and lifetime (70 years) x 365 for non-threshold effects.

Subsequently, the risk is quantified using the hazard quotient (HQ, unitless) or cancer risk (CR, unitless) depending on the effect type (USEPA, 2002), as follows:

$$HQ = \frac{ADI}{TRV}$$
$$CR = ADI \times TRV$$

Where *TRV* is the oral toxicity reference value expressed in mg PTE kg⁻¹ bw day⁻¹ for threshold effects and (mg kg⁻¹ bw day⁻¹) ⁻¹ for non-threshold effects. In the exposure assessment, the integration of bioavailability is involved in the calculation of *ADI* according to the following equation:

$$ADI = \frac{C \times IngR \times EF \times ED}{BW \times AT} \times BA$$

Where *BA* is the bioavailability of PTE in the soil matrix (unitless).

In the literature, the ADI calculated by directly considering bioaccessibility compared with the TRV. French agencies questioned this comparison's relevance (InVS and INERIS, 2012) because TRVs were defined as a reference matrix (aqueous solution or food) that served as a vector for pollutant administration. It is necessary to integrate the relative bioavailability or bioaccessibility of the pollutant in the soils compared to that of the same pollutant in the reference matrix to calculate risk. However, there is a lack of data concerning these values, so assumptions must be made to integrate the relative bioavailability or bioaccessibility. Therefore, the integration of these concepts must be justified, and the assumptions must be explained clearly. Using absolute oral bioavailability in HHRA requires construction of TRVs from absorbed (or internal) doses, which is not always possible. Hence, it is currently impossible to use the absolute bioavailability. However, relative bioavailability can be used to quantify the difference in the bioavailability of a PTE between the soil matrix and the reference matrix (origin of the TRV) used for risk calculation:

$$RBA = \frac{ABA_{soil}}{ABA_{TRV}} = \frac{BAc_{soil} \times fa_{soil}}{BAc_{TRV} \times fa_{TRV}}$$

where RBA is the relative bioavailability (unitless); ABA is the absolute bioavailability of the PTE in the soil or in the reference matrix used for TRV construction; BAc is the absolute bioaccessibility of the contaminant in the soil or the reference matrix used for TRV construction; fa is the factor of absorption of PTE from the soil or the reference matrix. RBA could therefore be used to calculate the adjusted ADI corresponding to the internal exposure to the PTE contained in the soil, considering its bioavailability in the matrix used to construct the TRV and in the soil studied. Thus, this adjusted ADI is directly comparable to the TRV reported in the literature (an external dose):

$$ADI_{adj} = ADI \times RBA = EDI \times \frac{BAc_{soil} \times fa_{soil}}{BAc_{TRV} \times fa_{TRV}}$$

Two alternatives can be used to refine the assumption that RBA is equal to 1 and to integrate the calculation of this parameter: (i) determine the ABA of the PTE in both the soil and the reference matrix, or (ii) determine the BAc (relative or absolute) and fa of the PTE. This review provides an overview of recent articles incorporating RBA or BAc into risk calculations (Table 7). Other existing national frameworks are also used to consider BAc or ABA in contaminated soil management (e.g. generic assessment criteria derived in the UK using the Contaminated Land Exposure Assessment CLEA model; Environment Agency, 2009; and guidance for state regulatory agencies in the US from Interstate Technology & Regulatory Council; ITRC, 2017). Risk calculations are often performed for elements not validated by in vivo tests. In most studies, BAc was directly integrated into the calculation of ADI by adjusting the total concentration instead of the RBA without explaining the validity of this substitution. This lack of explanation occurs even though several countries have developed guides or decision trees to help researchers ask the right questions before using in vitro bioaccessibility data for HHRA (Grøn and Andersen, 2003; Health Canada, 2017; InVS and INERIS, 2012; LABO, 2020; Ng et al., 2015; US EPA, 2012b). The most frequently asked questions were as follow: (i) Are the estimated risks (HQ or CR) exceeding the acceptable risk levels for soil ingestion exposure? (ii) Is the adjustment of the ADI by the RBA appropriate for this site and would it reduce the estimated risk? (iii) Is there a validated in vitro method for detecting contaminants of interest? These decision trees can guide the suitability of bioaccessibility. There are clear methodologies and equations for determining the bioaccessibility in HHRA. Two recent methodologies (from the US EPA and France, based on The Netherlands) for which information is readily available are detailed below. The US EPA provides precise and comprehensive guidance on integrating the bioavailability and bioaccessibility (BAc) for HHRA. They recommended using RBA based on the bioaccessibility of As and Pb in the soil to improve the characterization of site-specific risk assessments (US EPA, 2017b, 2021). US EPA Method 1340 is currently the recommended test for integrating BAc directly into the RBA calculation (US EPA, 2017a). This test simulated the gastric phase extraction of As and Pb from the soil in a relatively simple

extraction medium (glycine and pH adjustment with HCl). The regression models used to convert the BAc of As and Pb into RBA are as follows (Diamond et al., 2016; US EPA, 2007):

$$RBA As\% = 0.79 \times BAc\% + 3$$
$$RBA Pb\% = 0.878 \times BAc\% - 2.8$$

In France, InVS and INERIS (2012) issued an approach based on the RIVM report (Oomen et al., 2006) for bioaccessibility in HHRA, making calculating the RBA possible. For As and Cd, equal absorptions were retained regardless of whether they came from the soil matrix or the reference matrix (i.e., drinking water used for TRV construction), which means that fa_{soil} was equal to fa_{TRV} . This allowed the following simplification of the adjusted ADI:

$$ADI_{adj} = ADI \times \frac{BAc_{soil}}{BAc_{TRV}}$$

It has also been shown that the absolute bioaccessibilities of As and Cd in the G phase of drinking water are close to 100%, meaning that BAcTRV equals 1. This result allows for the following simplification:

$$ADI_{adj} = ADI \times BAc_{soil}$$

Thus, measuring the bioaccessibility of As and Cd is sufficient to adjust the estimated daily intake. A similar approach was conducted for Pb, considering the TRV established by WHO in 2012, which considered all sources of Pb (i.e., water, air, food) with the objective of not exceeding a blood Pb level of $50 \ \mu g L^{-1}$ in children. Anses the French agency recommends a value of $15 \ \mu g L^{-1}$ for all exposure pathways (i.e., water, air, food) and children and adults (Anses, 2013). Despite the revision of the TRV value used by HHRA in France, the approach applied for Pb remains valid. The adjusted exposure dose for Pb was calculated using assumptions regarding its bioavailability and absorption. In particular, studies have shown the absorption of Pb from food from 20 to 80% in children, depending on their age (Ziegler et al., 1978; DeMichele, 1984). Therefore, the maximum absorption value (fa_{soil} = 0.8) was selected. Additionally, the absolute bioavailability of Pb in the reference matrix was estimated to be 40% on average (Oomen et al., 2006). As Pb is not metabolized, the absorbed fraction is considered equal to the bioavailable fraction. This allows the following simplification of the adjusted ADI:

$$ADI_{adj} = ADI \times \frac{BAc_{soil} \times 0.8}{0.4} = ADI \times 2 \times BAc_{soil}$$

This methodology and the proposed ADI adjustment for As, Cd and Pb apply only to the BAc values from the UBM protocol. Moreover, depending on the objective of the study and the pollutant under consideration, the current French recommendation to integrate BAc into the calculation is to make a conservative choice for health by retaining the highest bioaccessibility value of the two phases or the one that presents the best correlation with the measured bioavailable fraction.

Reference	Country	PTE	In vitro test	Information about BAc integration in HHRA or RBA adjustement
Amponsah et al., (2022)	Ghana	As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Sb, Zn	US EPA Method 1340	RBA As (%) = 0.79 BAc (%) + 3 RBA Pb (%) = 0.878 BAc (%) - 2.8 Due to the lack of <i>in vivo/in vitro</i> equations for the remaining metals, RBA = BAc
Bari et al., (2021)	Australia	As	SBRC/PBET	In EDI calculation, BAc instead of C (i.e. RBA = BAc)
Cao et al., (2020)	Ghana	Cu, As, Cd, Pb, Sb	РВЕТ	RBA = BAc
Darko et al., (2017)	Ghana	Zn, Pb, Cu, Co, Ni, As, Cr	US EPA Method 1340	RBA = BAc
Darko et al., (2019)	Ghana	As, Cr, Ni, Fe, Co, Mn, Cu, Zn	US EPA Method 1340	RBA = BAc
Das et al., (2013)	India	As	SBET	RBA = BAc
Dehghani et al., (2018)	Iran	Cu, Pb, Zn	SBET	RBA = BAc
Diquattro et al., (2021)	Italy	Sb	SBRC	RBA = BAc
Dodd et al., (2023)	Ghana	Ag, As, Cd, Cr, Cu, Mo, Ni, Pb, Sb, Sn, Zn	US EPA Method 1340	RBA As = 0.79 BAc + 3 RBA Pb = 0.878 BAc - 2.8 Due to the lack of <i>in vivo/in vitro</i> equations for the remaining metals, RBA = BAc
Fang et al., (2023)	China	As, Zn	РВЕТ	RBA = BAc
Fernandez-Caliani et al., (2019)	Spain	As, Cu, Pb	UBM	RBA As = 0.59 BAc - G + 9.8 BAc-G Pb = 1.1 RBA Pb + 1.86
Girardeau et al., (2018)	France	As	UBM	RBA = BAc
Gu et al., (2016)	China	Cd, Pb, Cr, Ni, Cu, Zn, Fe, Mn	SBET	RBA = BAc
Guillén et al., (2021)	Spain	As, Cd, Co, Cr, Ni, Cu, Pb, Zn	SBET	BAc As = 1.0 RBA – 0.01 BAc Pb = 1.1 RBA + 1.86
Helser et al., (2022)	Belgium, Germany and Portugal	As, Cd, Cu, Pb, Zn	PBET/US EPA Method 1340	RBA = BAc
Hiller et al., (2017)	Slovak Republic	Cd, Cu, Hg, Pb, Zn	SBET	RBA = BAc
Izquierdo et al., (2015)	Spain	Ca, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn	SBET	RBA = BAc
Kasemodel and Rodrigues (2022)	Brazil	Cd, Pb	US EPA Method 1340	RBA = BAc
Laha et al., (2020)	India	As, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sb, Zn	SBET	RBA = BAc

Table 7. Overview of recent articles using bioaccessibility (BAc) or bioavailability (RBA) data in risk calculation for HHRA

Li et al., (2014)	China	As, Sb	SBET/PBET	RBA = BAc (which corresponds to the sum of the BAc obtained through PBET G and PBET I extraction)
Li et al., (2020)	China	As, Ba, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn	SBET/PBET/UBM/SBRC/IVG	RBA = BAc
Liu et al., (2018)	China	Pb, Cd, Zn	PBET	EDI x BAc
Luo et al., (2012)	China	Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn	SBET	RBA = BAc
Ma et al., (2019)	China	Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn	SBET	RBA = BAc
Ma et al., (2020)	China	As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn	SBET	RBA = BAc
Mohta at al. (2020) Italy		As Cd Co Cr Cu Ni Ph Zn	LIBM	RBA = ABA_{soil}/ABA_{ref} and ABA_{ref} assumed equal to 1 and ABA_{soil} =
	italy	As, cu, co, ci, cu, Ni, Pb, Zii		BAc as conservative proxi
Monneron-Gyurits et al., (2020)	France	Pb	UBM	RBA = BAc G
Moreira et al., (2018)	Brazil	Cr	US EPA Method 1340	RBA = BAc
Ning et al., (2021)	China	Tl, As, Sb, Hg	SBET/PBET	RBA = BAc
Wang (2023a)	China	As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn, Hg	SBET/PBET	RBA = BAc
Wang (2023b)	China	Sb	SBET	RBA = BAc
Yang et al., (2018)	China	Cr, Cu, Pb, Zn	SBET	RBA = BAc
Yin et al., (2021)	China	As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, and Zn	PBET/SHIME	RBA = BAc
Yu et al., (2012)	China	Cr	IVG	RBA = BAc
Zhong and Jiang (2017)	China	Ni	UBM	RBA = BAc

RBA: relative bioavailability; BAc: bioaccessibility; ABA_{soil}: absolute bioavailability in the soil matrix; ABA_{ref}: absolute bioavailability in the reference matrix: G: gastric phase; EDI: estimated daily intake; SBRC: Solubility/Bioavailability Research Consortium; SBET: Simple Based Extraction Test; PBET: Physiologically Based Extraction Test; UBM: Unified Barge Method; IVG: *In vitro* Gastrointestinal Test; SHIME: the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecology

1.1.5. Knowledge gaps, points for attention and future perspectives

- There are advantages and disadvantages associated with different methodologies currently available for estimating bioaccessibility. Decisions regarding the applicability of bioaccessibility estimates and the most appropriate protocol should consider the validation statues of any method and the associated IVIVC. The IVIVC is crucial for determining the validity of bioaccessibility assays as surrogate measures for refining bioavailability for human exposure and risk. The maximum criteria for validation were observed for US EPA Method 1340, PBET, UBM, RIVM, CAB, and IVG.
- The mouse assay can serve as a highly cost-effective alternative to more expensive assays (swine) for assessments of As RBA in soils, but it is important to remain cautious because results are not always consistent. In addition, comparison studies between mouse and piglet models are needed for PTEs other than As before mouse tests can also be used to estimate RBA.
- This highlights the issue of the choice of animal model. *In vivo* tests on models most similar to humans (primates or piglets) are more expensive and take longer than those on rodents (mice). Although some studies showed that RBA of swine is similar to mice (Diamond et al, 2016; Li et al., 2016), this is not always the case for all samples tested (Basta et al, 2016; Bradham et al., 2013). Comparison tests are also required for PTEs other than As. This suggests that we should remain critical of tests validated by a large number of *in vivo* tests, depending on the models used.
- Common *in vitro* extraction procedures for predicting the bioaccessibility of PTEs were developed for one or a few PTEs (mostly Pb, As, and Cd) and have been extended in numerous articles to various PTEs (e.g., Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Sb, and Zn), for which they have not yet been shown to be good analogs of *in vivo* conditions, suggesting the need for further studies to extend the validation of the most relevant *in vitro* tests to other PTEs of interest.
- The current study will significantly help researchers for better use and integration of bioaccessibility in HHRA. Some guides and official recommendations are well-documented and squarely focused on this use. At the same time, there is a certain vagueness in articles where bioaccessibility is directly integrated into HHRA without explanation, without considering the relative bioavailability or validity of the test. Moreover, risk calculations are often performed for PTEs not validated by *in vivo* tests.
- When choosing the soil size fraction, *in vitro* tests usually used < 2 mm, < 250 μm, or < 150 μm.
 In most cases, < 250 μm is the fraction of choice because it is considered the optimal size for adherence to children's hands. However, US EPA has shown that the fraction < 150 μm is more

suitable. In addition, it seems inappropriate to use the < 2 mm size fraction commonly used for soil analysis. However, the recommendation to use this size fraction in the German method (DIN) is explained by the fact that the trigger values in the German Federal Soil Protection and Contaminated Sites Ordinance for this particle size fraction were derived from < 2 mm. The DIN method was validated by an *in vivo* model that considered this specific fraction. Specific attention must be paid to the particle-size fraction under the selected test and *in vivo* validation.

- The bioaccessibility of soil contaminants depends on the PTE chemistry, soil properties, and chemical parameters of the simulated gastrointestinal fluids. Regarding this last point, differences in the pH of the acidic gastric digestion phase are the most likely explanation for the poor correspondence obtained with the different *in vitro* tests.
- The physico-chemical characteristics of soil have varying impacts on the bioaccessibility of
 PTEs. Soil particle size, physico-chemical properties such as OM content, sand and clay
 percentages, soil pH and complexing agents (Mn, Fe, and Si) can affect bioaccessibility.
 However, the results are highly variable. Moreover, numerous models and equations have
 been proposed demonstrating that the influence of the soil matrix is site-dependent.
 Depending on the *in vitro* test selected, it is easier to measure bioaccessibility directly.
- Chemical speciation should be considered because the toxicity of certain PTEs varies according to their oxidation states (As, Cr, and Sb). It would be interesting to study the reactions that occur when they encounter digestive fluids in a living being and to compare whether the simulated fluids are representative, as this will give us a better idea of the actual risk.

1.1.6. Conclusions

Managing contaminated soils of geogenic and (or) anthropogenic origins poses various challenges, and assessing the exposure of populations to PTEs is a significant concern. The ingestion of soil particles, particularly among sensitive populations such as children (hand-to-mouth behavior), is one of the main exposure routes. Regarding the HHRA, the exposure doses are often calculated by considering the total concentration of PTE in the soil. However, only the fraction of PTE extracted from the matrix, ingested, and absorbed by the organism (i.e., the bioavailable fraction) can induce a toxic effect. Therefore, many studies have considered the bioavailability of PTEs by determining their bioaccessibility and integrating this parameter into risk calculations. Several *in vitro* tests have been developed to estimate the bioaccessibility of PTEs, including PBET, SBET, SBRC, the US EPA Method 1340, CAB, IVG, UBM, and RIVM. A test is helpful in HHRA if it adequately represents the RBA. However, at present, most of the tests have only been validated for As and Pb, and to a lesser extent

for Cd (except for the DIN test, which has also been validated for Cr, Ni, and Hg), despite being widely used for other PTEs. This review emphasizes the importance of considering the bioaccessibility and the need for validated tests for other PTEs of interest. As per the literature, the physicochemical parameters of soils, total concentrations of PTEs, and their chemical forms influence the gastric and gastrointestinal bioaccessibility of PTEs. Correlations between different parameters and PTE bioaccessibility in soil varied from one study to another for the same element, indicating a multifactorial aspect governing PTE bioaccessibility in soils. This variability is due to the complexity of the soil matrix, different interactions between its constituents, and protocols used. Nevertheless, these factors affect bioaccessibility, which can help manage contaminated sites and soils more efficiently. The literature review also revealed disparities between the official recommendations and the methods used by researchers, which tend to incorporate bioaccessibility values into exposure or risk calculations without considering the RBA or test's validity. Therefore, there is a need to develop methodologies and guidelines that are more accessible, applicable, and understandable for incorporating bioaccessibility into health risk assessments.

1.1.7. References

Abdul, K.S.M., Jayasinghe, S.S., Chandana, E.P.S., Jayasumana, C., & De Silva, P.M.C.S. (2015). Arsenic and human health effects: A review. Environmental Toxicology and Pharmacology, 40, 828-846. https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.09.016

Amponsah, L.O., Dodd, M., & Darko, G. (2022). Gastric bioaccessibility and human health risks associated with soil metal exposure via ingestion at an E-waste recycling site in Kumasi, Ghana. Environmental Geochemistry and Health, 44, 497-509. <u>https://doi.org/10.1007/s10653-020-00760-7</u>

Anses. (2013). Opinion of the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (N° 2011-SA-0219). French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety.

Appleton, J.D., Cave, M.R., & Wragg, J. (2012). Modelling lead bioaccessibility in urban topsoils based on data from Glasgow, London, Northampton and Swansea, UK. Environmental Pollution, 171, 265-272. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.06.018

Assi, M.A., Hezmee, M.N.M., Haron, A.W., Sabri, M.Y., & Rajion, M.A. (2016). The detrimental effects of lead on human and animal health. Veterinary World, 9, 660-671. <u>https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.660-671</u>

Ayangbenro, A.S., & Babalola, O.O. (2017). A New Strategy for Heavy Metal Polluted Environments: A Review of Microbial Biosorbents. International Journal of Environmental Research and Public Health, 14, 94. <u>https://doi.org/10.3390/ijerph14010094</u>

Babaahmadifooladi, M., Jacxsens, L., Van de Wiele, T., & Laing, G.D. (2020). Gap analysis of nickel bioaccessibility and bioavailability in different food matrices and its impact on the nickel exposure assessment. Food Research International, 129, 108866. <u>https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108866</u>

Bagherifam, S., Brown, T.C., Fellows, C.M., & Naidu, R. (2019). Bioavailability of Arsenic and Antimony in Terrestrial Ecosystems: A Review. Pedosphere, 29, 681-720. <u>https://doi.org/10.1016/S1002-0160(19)60843-X</u>

Bari, A.S.M.F., Lamb, D., Choppala, G., Seshadri, B., Islam, Md.R., Sanderson, P., & Rahman, M.M. (2021). Arsenic bioaccessibility and fractionation in abandoned mine soils from selected sites in New South Wales, Australia and human health risk assessment. Ecotoxicology and Environmental Safety, 223, 112611. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112611

Barsby, A., McKinley, J.M., Ofterdinger, U., Young, M., Cave, M.R., & Wragg, J. (2012). Bioaccessibility of trace elements in soils in Northern Ireland. Science of The Total Environment, 433, 398-417. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.05.099

Basta, N.T., Foster, J.N., Dayton, E.A., Rodriguez, R.R., & Casteel, S.W. (2007). The effect of dosing vehicle on arsenic bioaccessibility in smelter-contaminated soils. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 42, 1275-1281. <u>https://doi.org/10.1080/10934520701434927</u>

Basta, N.T., Stevens, B., Whitacre, S., Scheckel, K., Betts, A., Bradham, K., Thomas, D., Schadt, C. (2016). Mechanisms and Permanence of Sequestered Pb and As in Soils: Impact on Human Bioavailability. SERDP Project ER-1742, Strategic Environmental Research and Development Program, Alexandria, VA.

Basta, N.T., & Juhasz, A. (2014). Using *In vivo* Bioavailability and/or *In vitro* Gastrointestinal Bioaccessibility Testing to Adjust Human Exposure to Arsenic from Soil Ingestion. Reviews in Mineralogy and Geochemistry, 79, 451-472. <u>https://doi.org/10.2138/rmg.2014.79.9</u>

Basta, N.T., Pantone, D.J., & Tabatabai, M.A. (1993). Path Analysis of Heavy Metal Adsorption by Soil. Agronomy Journal, 85 1054-1057. <u>https://doi.org/10.2134/agronj1993.00021962008500050018x</u>

Bavec, Š., & Gosar, M. (2016). Speciation, mobility and bioaccessibility of Hg in the polluted urban soil of Idrija (Slovenia). Geoderma, 273, 115-130. http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2016.03.015

Blais, J.F., Djedidi, Z., Cheikh, R.B., Tyagi, R.D., & Mercier, G. (2008). Metals Precipitation from Effluents: Review. Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management, 12, 135-149. https://doi.org/10.1061/(ASCE)1090-025X(2008)12:3(135)

Boisa, N., Bird, G., Brewer, P.A., Dean, J.R., Entwistle, J.A., Kemp, S.J., & Macklin, M.G. (2013). Potentially harmful elements (PHEs) in scalp hair, soil and metallurgical wastes in Mitrovica, Kosovo: The role of oral bioaccessibility and mineralogy in human PHE exposure. Environment International, 60, 56-70. https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.07.014

Bourliva, A., Aidona, E., Papadopoulou, L., Ferreira da Silva, E., & Patinha, C. (2021). Levels, oral bioaccessibility and health risk of sand-bound potentially harmful elements (PHEs) in public playgrounds: Exploring magnetic properties as a pollution proxy. Environmental Pollution, 290, 118122. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118122

Bradham, K. D., Diamond, G. L., Scheckel, K. G., Hughes, M. F., Casteel, S. W., Miller, B. W., Klotzbach, J. M., Thayer, W. C., & Thomas, D. J. (2013). Mouse Assay for Determination of Arsenic Bioavailability in Contaminated Soils. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 76, 815-826. <u>https://doi.org/10.1080/15287394.2013.821395</u>

Bradham, K. D., Green, W., Hayes, H., Nelson, C., Alava, P., Misenheimer, J., Diamond, G. L., Thayer, W. C., & Thomas, D. J. (2016). Estimating relative bioavailability of soil lead in the mouse. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 79(24), 1179-1182. <u>https://doi.org/10.1080/15287394.2016.1221789</u>

Bradham, K.D., Nelson, C., Juhasz, A.L., Smith, E., Scheckel, K., Obenour, D.R., Miller, B.W., & Thomas, D.J. (2015). Independent Data Validation of an *in vitro* Method for the Prediction of the Relative Bioavailability of Arsenic in Contaminated Soils. Environmental Science & Technology, 49, 6312-6318. <u>https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00905</u> Brattin, W., Drexler, J., Lowney, Y., Griffin, S., Diamond, G., & Woodbury, L. (2013). An *In vitro* Method for Estimation of Arsenic Relative Bioavailability in Soil. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 76, 458-478. <u>https://doi.org/10.1080/15287394.2013.771765</u>

Broadway, A., Cave, M.R., Wragg, J., Fordyce, F.M., Bewley, R.J.F., Graham, M.C., Ngwenya, B.T., & Farmer, J.G. (2010). Determination of the bioaccessibility of chromium in Glasgow soil and the implications for human health risk assessment. Science of The Total Environment, 409, 267-277. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.09.007

Bulgariu, D., Juravle, D., Bulgariu, L., Macoveanu, M., & Rusu, C. (2008). Distribution and migration of chrome in urban soils—Case study: Iaşi City (industrial zone). Environmental Engineering and Management Journal, 7, 277-288. <u>https://doi.org/10.30638/eemj.2008.031</u>

Caboche, J., Denys, S., Feidt, C., Delalain, P., Tack, K., & Rychen, G. (2010). Modelling Pb bioaccessibility in soils contaminated by mining and smelting activities. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 45, 1264-1274. <u>https://doi.org/10.1080/10934529.2010.493818</u>

Cai, M., McBride, M.B., & Li, K. (2016). Bioaccessibility of Ba, Cu, Pb, and Zn in urban garden and orchard soils. Environmental Pollution, 208, 145-152. <u>https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.09.050</u>

Cánovas, C.R., Quispe, D., Macías, F., Callejón-Leblic, B., Arias-Borrego, A., García-Barrera, T., & Nieto, J.M. (2023). Potential release and bioaccessibility of metal/loids from mine wastes deposited in historical abandoned sulfide mines. Environmental Pollution, 316, 120629. <u>https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120629</u>

Cao, P., Fujimori, T., Juhasz, A., Takaoka, M., & Oshita, K. (2020). Bioaccessibility and human health risk assessment of metal(loid)s in soil from an e-waste open burning site in Agbogbloshie, Accra, Ghana. Chemosphere, 240, 124909. <u>https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124909</u>

Chu, Z., Lin, C., Yang, K., Cheng, H., Gu, X., Wang, B., Wu, L., & Ma, J. (2022). Lability, bioaccessibility, and ecological and health risks of anthropogenic toxic heavy metals in the arid calcareous soil around a nonferrous metal smelting area. Chemosphere, 307, 136200. <u>https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136200</u>

Cornu, S., & Clozel, B. (2000). Extractions séquentielles et spéciation des éléments trace métalliques dans. Etude et Gestion des Sols, 7(3), 179-189.

Cox, S.F., Chelliah, M.C.M., McKinley, J.M., Palmer, S., Ofterdinger, U., Young, M.E., Cave, M.R., & Wragg, J. (2013). The importance of solid-phase distribution on the oral bioaccessibility of Ni and Cr in soils overlying Palaeogene basalt lavas, Northern Ireland. Environmental Geochemistry and Health, 35, 553-567. https://doi.org/10.1007/s10653-013-9539-6

Cox, S.F., Rollinson, G., & McKinley, J.M. (2017). Mineralogical characterisation to improve understanding of oral bioaccessibility of Cr and Ni in basaltic soils in Northern Ireland. Journal of Geochemical Exploration, 183, 166-177. <u>https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2017.02.006</u>

Darko, G., Boakye, K.O., Nkansah, M.A., Gyamfi, O., Ansah, E., Yevugah, L.L., Acheampong, A., & Dodd, M. (2019). Human Health Risk and Bioaccessibility of Toxic Metals in Topsoils from Gbani Mining Community in Ghana. Journal of Health and Pollution, 9, 190602. <u>https://doi.org/10.5696/2156-9614-9.22.190602</u>

Darko, G., Dodd, M., Nkansah, M.A., Ansah, E., & Aduse-Poku, Y. (2017). Distribution and bioaccessibility of metals in urban soils of Kumasi, Ghana. Environmental Monitoring and Assessment, 189, 260. https://doi.org/10.1007/s10661-017-5972-9

Das, S., Jean, J.-S., & Kar, S. (2013). Bioaccessibility and health risk assessment of arsenic in arsenic-enriched soils,CentralIndia.EcotoxicologyandEnvironmentalSafety,92,252-257.https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.02.016

Davis, A., Ruby, M.V., Bloom, M., Schoof, R., Freeman, G., & Bergstrom, P.D. (1996). Mineralogic Constraints on the Bioavailability of Arsenic in Smelter-Impacted Soils. Environmental Science & Technology, 30(2), 392-399.

De Miguel, E., Mingot, J., Chacón, E., & Charlesworth, S. (2012). The relationship between soil geochemistry and the bioaccessibility of trace elements in playground soil. Environmental Geochemistry and Health, 34, 677-687. https://doi.org/10.1007/s10653-012-9486-7

Dehghani, S., Moore, F., Vasiluk, L., & Hale, B.A. (2018). The influence of physicochemical parameters on bioaccessibility-adjusted hazard quotients for copper, lead and zinc in different grain size fractions of urban street dusts and soils. Environmental Geochemistry and Health, 40, 1155-1174. <u>https://doi.org/10.1007/s10653-017-9994-6</u>

DeMichele, S.J. (1984). Nutrition of lead. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 78, 401-408. <u>https://doi.org/10.1016/0300-9629(84)90567-X</u>

Denys, S., Caboche, J., Tack, K., Rychen, G., Wragg, J., Cave, M., Jondreville, C., & Feidt, C. (2012). *In vivo* Validation of the Unified BARGE Method to Assess the Bioaccessibility of Arsenic, Antimony, Cadmium, and Lead in Soils. Environmental Science & Technology, 46, 6252-6260. <u>https://doi.org/10.1021/es3006942</u>

Denys, S., Tack, K., Caboche, J., & Delalain, P. (2008). Bioaccessibility, solid phase distribution, and speciation of Sb in soils and in digestive fluids. Chemosphere, 74, 711-716. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.09.088

Diamond, G.L., Bradham, K.D., Brattin, W.J., Burgess, M., Griffin, S., Hawkins, C.A., Juhasz, A.L., Klotzbach, J.M., Nelson, C., Lowney, Y.W., Scheckel, K.G., & Thomas, D.J. (2016). Predicting oral relative bioavailability of arsenic in soil from *in vitro* bioaccessibility. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 79, 165-173. http://dx.doi.org/10.1080/15287394.2015.1134038

Diamond, G. L., Thomas, D. J., & Bradham, K. D. (2022). Evaluating the mouse model for estimation of arsenic bioavailability : Comparison of estimates of absolute bioavailability of inorganic arsenic in mouse, humans, and other species. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 85, 815-825. https://doi.org/10.1080/15287394.2022.2095314

Ding, S., Guan, D.-X., Dai, Z.-H., Su, J., Teng, H. H., Ji, J., Liu, Y., Yang, Z., & Ma, L.Q. (2022). Nickel bioaccessibility in soils with high geochemical background and anthropogenic contamination. Environmental Pollution, 310, 119914. <u>https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119914</u>

Ding, Z., & Hu, X. (2014). Ecological and human health risks from metal(loid)s in peri-urban soil in Nanjing, China. Environmental Geochemistry and Health, 36, 399-408. <u>https://doi.org/10.1007/s10653-013-9568-1</u>

Diquattro, S., Castaldi, P., Ritch, S., Juhasz, A.L., Brunetti, G., Scheckel, K.G., Garau, G., & Lombi, E. (2021). Insights into the fate of antimony (Sb) in contaminated soils: Ageing influence on Sb mobility, bioavailability, bioaccessibility and speciation. Science of The Total Environment, 770, 145354. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145354

Dodd, M., Amponsah, L.O., Grundy, S., & Darko, G. (2023). Human health risk associated with metal exposure at Agbogbloshie e-waste site and the surrounding neighbourhood in Accra, Ghana. Environmental Geochemistry and Health. <u>https://doi.org/10.1007/s10653-023-01503-0</u>

Dodd, M., Richardson, G.M., Wilson, R., Rencz, A., & Friske, P. (2017). Elemental concentrations and *in vitro* bioaccessibility in Canadian background soils. Environmental Geochemistry and Health, 39, 759-777. https://doi.org/10.1007/s10653-016-9846-9

Drexler, J.W., & Brattin, W.J. (2007). An *In vitro* Procedure for Estimation of Lead Relative Bioavailability: With Validation. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal, 13, 383-401. https://doi.org/10.1080/10807030701226350 Du, H., Yin, N., Cai, X., Wang, P., Li, Y., Fu, Y., Sultana, Mst. S., Sun, G., & Cui, Y. (2020). Lead bioaccessibility in farming and mining soils: The influence of soil properties, types and human gut microbiota. Science of The Total Environment, 708, 135227. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135227</u>

Environment Agency. (2009). CLEA Software (Version 1.05) Handbook. Science report: SC050021/SR4, Books Abroad. Bristol, IK; doi:10.2307/40115099.

Fang, Y., Cui, Y., Mou, X., Lu, L., Shentu, J., & Zhu, M. (2023). *In vitro* Bioaccessibility and Health Risk Assessment of Arsenic and Zinc Contaminated Soil Stabilized by Ferrous Sulfate: Effect of Different Dietary Components. Toxics, 11, 23. <u>https://doi.org/10.3390/toxics11010023</u>

FAO, & UNEP. (2021). Global assessment of soil pollution—Summary for policy makers. Rome, FAO. <u>https://doi.org/10.4060/cb4827en</u>

Fendorf, S., La Force, M.J., & Li, G. (2004). Temporal Changes in Soil Partitioning and Bioaccessibility of Arsenic, Chromium, and Lead. Journal of Environmental Quality, 33, 2049-2055. <u>https://doi.org/10.2134/jeq2004.2049</u>

Fernández-Caliani, J.C. (2019). Oral bioaccessibility and human health risk assessment of trace elements in
agricultural soils impacted by acid mine drainage. 237, 124441.
https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124441

Filella, M., Belzile, N., & Chen, Y.-W. (2002). Antimony in the environment: A review focused on natural waters I. Occurrence. Earth-Science Reviews, 57, 125-176. <u>https://doi.org/10.1016/S0012-8252(01)00070-8</u>

Finžgar, N., Tlustoš, P., & Leštan, D. (2007). Relationship of soil properties to fractionation, bioavailability and mobility of lead and zinc in soil. Plant, Soil and Environment, 53, 225-238. <u>https://doi.org/10.17221/2201-PSE</u>

Flora, G., Gupta, D., & Tiwari, A. (2012). Toxicity of lead: A review with recent updates. Interdisciplinary Toxicology, 5, 47-58. <u>https://doi.org/10.2478/v10102-012-0009-2</u>

Girardeau, I., Coftier, A., & Conte, T. (2018). Using bioaccessibility testing in health risk assessment as a decision support tool for appropriate redevelopment of former mining sites : A French case study. Mine Closure 2018, Leipzig, Germany, 13. <u>https://doi.org/hal-01855318</u>

Girouard, E., & Zagury, G.J. (2009). Arsenic bioaccessibility in CCA-contaminated soils: Influence of soil properties, arsenic fractionation, and particle-size fraction. Science of The Total Environment, 407, 2576-2585. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.12.019

Goix, S., Uzu, G., Oliva, P., Barraza, F., Calas, A., Castet, S., Point, D., Masbou, J., Duprey, J.-L., Huayta, C., Chincheros, J., & Gardon, J. (2016). Metal concentration and bioaccessibility in different particle sizes of dust and aerosols to refine metal exposure assessment. Journal of Hazardous Materials, 317, 552-562. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.05.083

González-Grijalva, B., Meza-Figueroa, D., Romero, F. M., Robles-Morúa, A., Meza-Montenegro, M., García-Rico, L., & Ochoa-Contreras, R. (2019). The role of soil mineralogy on oral bioaccessibility of lead: Implications for land use and risk assessment. Science of The Total Environment, 657, 1468-1479. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.148

Grøn, C., & Andersen, L. (2003). Human Bioaccessibility of Heavy Metals and PAH from Soil; Danish EPA. Technology Programme for Soil and Groundwater Contamination, 840, 113.

Gu, Y.-G., Gao, Y.-P., & Lin, Q. (2016). Contamination, bioaccessibility and human health risk of heavy metals in exposed-lawn soils from 28 urban parks in southern China's largest city, Guangzhou. Applied Geochemistry, 67, 52-58. <u>https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2016.02.004</u>

Guillén, M.T., Delgado, J., Gómez-Arias, A., Nieto-Liñán, J.M., & Castillo, J. (2022). Bioaccessibility and human exposure to metals in urban soils (Huelva, SW Spain): Evaluation by *in vitro* gastric extraction. Environmental Geochemistry and Health, 44, 1501-1519. <u>https://doi.org/10.1007/s10653-021-00814-4</u>

Hack, A., Welge, P., Wittsiepe, J., & Wilhelm, M. (2002). Aufnahme und Bilanzierung (Bioverfügbarkeit) ausgewählter Bodenkontaminanten im Tiermodell (Minischwein) (298 73 227/01). Umweltbundesamt.

He, Z., Shentu, J., Yang, X., Baligar, V.C., Zhang, T., & Stoffella, P.J. (2015). Heavy Metal Contamination of Soils : Sources, Indicators, and Assessment. Journal of Environmental Indicators, 9, 17-18.

Health Canada. (2017). Federal Contaminated Site Risk Assessment In Canada: Supplemental Guidance on Human Health Risk Assessment for Oral Bioavailability of Substances in Soil and Soil-Like Media. http://publications.gc.ca/collections/collection_2018/sc-hc/H144-46-2017-fra.pdf

Helser, J., Vassilieva, E., & Cappuyns, V. (2022). Environmental and human health risk assessment of sulfidic mine waste: Bioaccessibility, leaching and mineralogy. Journal of Hazardous Materials, 424, 127313. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127313

Hiller, E., Mihaljevič, M., Filová, L., Lachká, L., Jurkovič, Ľ., Kulikova, T., Fajčíková, K., Šimurková, M., & Tatarková, V. (2017). Occurrence of selected trace metals and their oral bioaccessibility in urban soils of kindergartens and parks in Bratislava (Slovak Republic) as evaluated by simple *in vitro* digestion procedure. Ecotoxicology and Environmental Safety, 144, 611-621. <u>https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.06.040</u>

Hiller, E., Pilková, Z., Filová, L., Mihaljevič, M., Špirová, V., & Jurkovič, Ľ. (2022). Metal(loid) concentrations, bioaccessibility and stable lead isotopes in soils and vegetables from urban community gardens. Chemosphere, 305, 135499. <u>https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135499</u>

Ikegami, M., Yoneda, M., Tsuji, T., Bannai, O., & Morisawa, S. (2014). Effect of Particle Size on Risk Assessment of Direct Soil Ingestion and Metals Adhered to Children's Hands at Playgrounds. Risk Analysis, 34, 1677-1687. https://doi.org/10.1111/risa.12215

INVS, & INERIS. (2012). Quantités de terre et poussières ingérées par un enfant de moins de 6 ans et bioaccessibilité des polluants : État des connaissances et propositions. Institut national de l'environnement et des risques industriels. Institut de veille sanitaire.

ISO 17402 (2011). Soil quality – Requirements and guidance for the selection and application of methods for the assessment of bioavailability of contaminants in soil and soil materials.

ISO 17924 (2019). Soil quality — Assessment of human exposure from ingestion of soil and soil material — Procedure for the estimation of the human bioaccessibility/bioavailability of metals in soil.

Izquierdo, M., De Miguel, E., Ortega, M.F., & Mingot, J. (2015). Bioaccessibility of metals and human health risk assessment in community urban gardens. Chemosphere, 135, 312-318. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.079

Jardine, P.M., Stewart, M.A., Barnett, M.O., Basta, N.T., Brooks, S.C., Fendorf, S., & Mehlhorn, T.L. (2013). Influence of Soil Geochemical and Physical Properties on Chromium(VI) Sorption and Bioaccessibility. Environmental Science & Technology, 47, 11241-11248. <u>https://doi.org/10.1021/es401611h</u>

Jorge Mendoza, C., Tatiana Garrido, R., Cristian Quilodrán, R., Matías Segovia, C., & José Parada, A. (2017). Evaluation of the bioaccessible gastric and intestinal fractions of heavy metals in contaminated soils by means of a simple bioaccessibility extraction test. Chemosphere, 176, 81-88. <u>https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.066</u>

Juhasz, A.L., Herde, P., Herde, C., Boland, J., & Smith, E. (2014a). Validation of the Predictive Capabilities of the Sbrc-G *in vitro* Assay for Estimating Arsenic Relative Bioavailability in Contaminated Soils. Environmental Science & Technology, 48, 1296212969. <u>https://doi.org/10.1021/es503695g</u>

Juhasz, A.L., Smith, E., Weber, J., Rees, M., Kuchel, T., Rofe, A., Sansom, L., & Naidu, R. (2013). Predicting lead relative bioavailability in peri-urban contaminated soils using *in vitro* bioaccessibility assays. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 48, 604-611. <u>http://dx.doi.org/10.1080/10934529.2013.731354</u>

Juhasz, A.L., Herde, P., Herde, C., Boland, J., & Smith, E. (2015). Predicting Arsenic Relative Bioavailability Using Multiple *in vitro* Assays: Validation of *in vivo–in vitro* Correlations. Environmental Science & Technology, 49, 11167-11175. <u>https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02508</u>

Juhasz, A.L., Smith, E., Nelson, C., Thomas, D. J., & Bradham, K. (2014b). Variability Associated with As *in vivo–in vitro* Correlations When Using Different Bioaccessibility Methodologies. Environmental Science & Technology, 48, 1164611653. <u>https://doi.org/10.1021/es502751z</u>

Juhasz, A.L., Smith, E., Weber, J., Rees, M., Rofe, A., Kuchel, T., Sansom, L., & Naidu, R. (2007a). *In vitro* assessment of arsenic bioaccessibility in contaminated (anthropogenic and geogenic) soils. Chemosphere, 69, 69-78. <u>https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.04.046</u>

Juhasz, A.L., Smith, E., Weber, J., Rees, M., Rofe, A., Kuchel, T., Sansom, L., & Naidu, R. (2007b). Comparison of *in vivo* and *in vitro* methodologies for the assessment of arsenic bioavailability in contaminated soils. Chemosphere, 69, 961-966. <u>https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.05.018</u>

Juhasz, A.L., Weber, J., Naidu, R., Gancarz, D., Rofe, A., Todor, D., & Smith, E. (2010). Determination of Cadmium Relative Bioavailability in Contaminated Soils and Its Prediction Using *in vitro* Methodologies. Environmental Science & Technology, 44, 5240-5247. <u>https://doi.org/10.1021/es1006516</u>

Juhasz, A.L., Weber, J., Smith, E., Naidu, R., Rees, M., Rofe, A., Kuchel, T., & Sansom, L. (2009a). Assessment of Four Commonly Employed *in vitro* Arsenic Bioaccessibility Assays for Predicting *in vivo* Relative Arsenic Bioavailability in Contaminated Soils. Environmental Science & Technology, 43, 9487-9494. <u>https://doi.org/10.1021/es902427y</u>

Juhasz, A.L., Weber, J., Smith, E., Naidu, R., Marschner, B., Rees, M., Rofe, A., Kuchel, T., & Sansom, L. (2009b). Evaluation of SBRC-Gastric and SBRC-Intestinal Methods for the Prediction of *In vivo* Relative Lead Bioavailability in Contaminated Soils. Environmental Science & Technology, 43, 4503-4509. <u>https://doi.org/10.1021/es803238u</u>

Kalbitz, K., & Wennrich, R. (1998). Mobilization of heavy metals and arsenic in polluted wetland soils and its dependence on dissolved organic matter. Science of The Total Environment, 209, 27-39. <u>https://doi.org/10.1016/S0048-9697(97)00302-1</u>

Karadaş, C., & Kara, D. (2011). *In vitro* gastro-intestinal method for the assessment of heavy metal bioavailability in contaminated soils. Environmental Science and Pollution Research, 18, 620-628. <u>https://doi.org/10.1007/s11356-010-0404-1</u>

Karna, R.R., Noerpel, M., Betts, A.R., & Scheckel, K.G. (2017). Lead and Arsenic Bioaccessibility and Speciation as a Function of Soil Particle Size. Journal of Environmental Quality, 46, 1225-1235. https://doi.org/10.2134/jeq2016.10.0387

Kasemodel, M.C., & Rodrigues, V.G.S. (2022). Soil Particle Size Fractioning and Pb and Cd Bioaccessibility on a Dirt Road Near Former Beneficiation and Smelting Plant. Water, Air, & Soil Pollution, 233, 478. <u>https://doi.org/10.1007/s11270-022-05936-8</u>

Kelepertzis, E., & Argyraki, A. (2015). Geochemical associations for evaluating the availability of potentially harmful elements in urban soils: Lessons learnt from Athens, Greece. Applied Geochemistry, 59, 63-73. https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2015.03.019

Kelepertzis, E., & Stathopoulou, E. (2013). Availability of geogenic heavy metals in soils of Thiva town (central Greece). Environmental Monitoring and Assessment, 185, 9603-9618. <u>https://doi.org/10.1007/s10661-013-3277-1</u>

Kelley, M.E., Brauning, S.E., Schoof, R.A., & Ruby, M.V. (2002). Assessing oral bioavailability of metals in soil. Battelle Press.

Kerger, B.D., Paustenbach, D.J., Corbett, G.E., & Finley, B.L. (1996). Absorption and Elimination of Trivalent and Hexavalent Chromium in Humans Following Ingestion of a Bolus Dose in Drinking Water. Toxicology and Applied Pharmacology, 141, 145-158.

Kierulf, A., Ollson, C., Whitehead, C., Beauchemin, D., & Koch, I. (2022). Literature review and meta-analysis of gastric and intestinal bioaccessibility for nine inorganic elements in soils and soil-like media for use in human health risk assessment. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 240, 113929. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2022.113929

Kirman, C.R., Suh, M., Hays, S.M., Gürleyük, H., Gerads, R., De Flora, S., Parker, W., Lin, S., Haws, L.C., Harris, M.A., & Proctor, D.M. (2016). Reduction of hexavalent chromium by fasted and fed human gastric fluid. II. Ex vivo gastric reduction modeling. Toxicology and Applied Pharmacology, 306, 120-133. https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.07.002

Koch, I., Reimer, K.J., Bakker, M.I., Basta, N.T., Cave, M.R., Denys, S., Dodd, M., Hale, B.A., Irwin, R., Lowney, Y.W., Moore, M.M., Paquin, V., Rasmussen, P.E., Repaso-Subang, T., Stephenson, G.L., Siciliano, S.D., Wragg, J., & Zagury, G.J. (2013). Variability of bioaccessibility results using seventeen different methods on a standard reference material, NIST 2710. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 48, 641-655. https://doi.org/10.1080/10934529.2013.731817

Kumar, S., & Sharma, A. (2019). Cadmium toxicity: Effects on human reproduction and fertility. Reviews on Environmental Health, 34, 327-338. <u>https://doi.org/10.1515/reveh-2019-0016</u>

LABO. (2020). Arbeitshilfe zur Expositionsabschätzung in der Detailuntersuchung Wirkungspfad Boden-Mensch Wirkungspfad Boden-Nutzpflanze-Mensch. Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Bodenschutz.

Laha, T., Gope, M., Datta, S., Masto, R.E., & Balachandran, S. (2020). Oral bioaccessibility of potentially toxic elements (PTEs) and related health risk in urban playground soil from a medieval bell metal industrial town Khagra, India. Environmental Geochemistry and Health. <u>https://doi.org/10.1007/s10653-020-00715-y</u>

Lake, L.M., Basta, N.T., & Barker, D.J. (2021). Modifying Effect of Soil Properties on Bio-Accessibility of As and PbfromHumanIngestionofContaminatedSoil.Geosciences,11,126.https://doi.org/10.3390/geosciences11030126

Li, H.-B., Li, M.-Y., Zhao, D., Li, J., Li, S.-W., Xiang, P., Juhasz, A.L., & Ma, L.Q. (2019). Arsenic, lead, and cadmium bioaccessibility in contaminated soils: Measurements and validations. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 50, 1303-1338. <u>https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1656512</u>

Li, J., Li, K., Cui, X.-Y., Basta, N.T., Li, L.-P., Li, H.-B., & Ma, L.Q. (2015a). *In vitro* bioaccessibility and *in vivo* relative bioavailability in 12 contaminated soils: Method comparison and method development. Science of The Total Environment, 532, 812-820. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.113</u>

Li, J., Li, K., Cave, M., Li, H.-B., & Ma, L.Q. (2015b). Lead bioaccessibility in 12 contaminated soils from China : Correlation to lead relative bioavailability and lead in different fractions. Journal of Hazardous Materials, 295, 55-62. <u>https://doi.org/10.1016/i.jhazmat.2015.03.061</u>

Li, J., Wei, Y., Zhao, L., Zhang, J., Shangguan, Y., Li, F., & Hou, H. (2014). Bioaccessibility of antimony and arsenic in highly polluted soils of the mine area and health risk assessment associated with oral ingestion exposure. Ecotoxicology and Environmental Safety, 110, 308-315. <u>https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.009</u>

Li, S.-W., Chang, M., Huang, X., Li, H., Li, H.-B., & Ma, L.Q. (2022). Coupling *in vitro* assays with sequential extraction to investigate cadmium bioaccessibility in contaminated soils. Chemosphere, 288, 132655. <u>https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132655</u> Li, S.-W., Liu, X., Sun, H.-J., Li, M.-Y., Zhao, D., Luo, J., Li, H.-B., & Ma, L.Q. (2017). Effect of phosphate amendment on relative bioavailability and bioaccessibility of lead and arsenic in contaminated soils. Journal of Hazardous Materials, 339, 256-263. <u>https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.06.040</u>

Li, Y., Padoan, E., & Ajmone-Marsan, F. (2021). Soil particle size fraction and potentially toxic elements bioaccessibility: A review. Ecotoxicology and Environmental Safety, 209, 111806. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111806

Liang, S., Guan, D.-X., Li, J., Zhou, C.-Y., Luo, J., & Ma, L.Q. (2016). Effect of aging on bioaccessibility of arsenic and lead in soils. Chemosphere, 151, 94-100. <u>https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.070</u>

Liu, S., Tian, S., Li, K., Wang, L., & Liang, T. (2018). Heavy metal bioaccessibility and health risks in the contaminated soil of an abandoned, small-scale lead and zinc mine. Environmental Science and Pollution Research, 25, 15044-15056. <u>https://doi.org/10.1007/s11356-018-1660-8</u>

Liu, Y., Ma, J., Yan, H., Ren, Y., Wang, B., Lin, C., & Liu, X. (2016). Bioaccessibility and health risk assessment of arsenic in soil and indoor dust in rural and urban areas of Hubei province, China. Ecotoxicology and Environmental Safety, 126, 14-22. <u>https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.11.037</u>

Ljung, K., Oomen, A., Duits, M., Selinus, O., & Berglund, M. (2007). Bioaccessibility of metals in urban playground soils. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 42, 1241-1250. https://doi.org/10.1080/10934520701435684

Louzon, M., Pelfrêne, A., Pauget, B., Gimbert, F., Morin-Crini, N., Douay, F., & de Vaufleury, A. (2020). Bioaccessibility of metal(loid)s in soils to humans and their bioavailability to snails: A way to associate human health and ecotoxicological risk assessment? Journal of Hazardous Materials, 384, 121432. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121432

Lu, Y., Yin, W., Huang, L., Zhang, G., & Zhao, Y. (2011). Assessment of bioaccessibility and exposure risk of arsenic and lead in urban soils of Guangzhou City, China. Environmental Geochemistry and Health, 33(2), 93-102. https://doi.org/10.1007/s10653-010-9324-8

Luo, X.-S., Ding, J., Xu, B., Wang, Y.-J., Li, H.-B., & Yu, S. (2012). Incorporating bioaccessibility into human health risk assessments of heavy metals in urban park soils. Science of The Total Environment, 424, 88-96. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.02.053

Ma, J., Li, Y., Liu, Y., Lin, C., & Cheng, H. (2019). Effects of soil particle size on metal bioaccessibility and healthriskassessment.EcotoxicologyandEnvironmentalSafety,186,109748.https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109748

Ma, J., Li, Y., Liu, Y., Wang, X., Lin, C., & Cheng, H. (2020). Metal(loid) bioaccessibility and children's health risk assessment of soil and indoor dust from rural and urban school and residential areas. Environmental Geochemistry and Health, 42, 1291-1303. <u>https://doi.org/10.1007/s10653-019-00415-2</u>

Madrid, F., Biasioli, M., & Ajmone-Marsan, F. (2008). Availability and Bioaccessibility of Metals in Fine Particles of Some Urban Soils. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 55, 2132. https://doi.org/10.1007/s00244-007-9086-1

Marin Villegas, C.A., Zagury, G.J. (2023). Incorporating oral, inhalation and dermal bioaccessibility into human health risk characterization following exposure to Chromated Copper Arsenate (CCA)-contaminated soils. Ecotoxicology and Environmental Safety, 249, 114446. <u>https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114446</u>

Mehta, N., Cipullo, S., Cocerva, T., Coulon, F., Dino, G.A., Ajmone-Marsan, F., Padoan, E., Cox, S.F., Cave, M.R., & De Luca, D.A. (2020). Incorporating oral bioaccessibility into human health risk assessment due to potentially toxic elements in extractive waste and contaminated soils from an abandoned mine site. Chemosphere, 255, 126927. <u>https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126927</u>

Mehta, N., Cocerva, T., Cipullo, S., Padoan, E., Dino, G.A., Ajmone-Marsan, F., Cox, S.F., Coulon, F., & De Luca, D.A. (2019). Linking oral bioaccessibility and solid phase distribution of potentially toxic elements in extractive waste and soil from an abandoned mine site: Case study in Campello Monti, NW Italy. Science of The Total Environment, 651, 2799-2810. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.115</u>

Meunier, L., Walker, S.R., Wragg, J., Parsons, M.B., Koch, I., Jamieson, H.E., & Reimer, K.J. (2010). Effects on soil composition and mineralogy on the bioaccessibility of arsenic from tailings and soil in gold mine districts of Nova Scotia. Environmental Science & Technology, 44, 2667-2674. <u>https://doi.org/10.1021/es9035682</u>

Monneron-Gyurits, M., Joussein, E., Courtin-Nomade, A., Grauby, O., Paineau, E., Reguer, S., & Soubrand, M. (2022). A fast one-pot synthesize of crystalline anglesite by hydrothermal synthesis for environmental assessment on pure phase. Environmental Science and Pollution Research, 29, 17373-17381. https://doi.org/10.1007/s11356-021-17011-6

Monneron--Gyurits, M., Soubrand, M., Joussein, E., Courtin-Nomade, A., Jubany, I., Casas, S., Bahí, N., Faz, A., Gabarrón, M., Acosta, J.A., & Martínez-Martínez, S. (2020). Investigating the relationship between speciation and oral/lung bioaccessibility of a highly contaminated tailing : Contribution in health risk assessment. Environmental Science and Pollution Research, 27, 40732-40748. <u>https://doi.org/10.1007/s11356-020-10074-x</u>

Moreira, L.J.D., da Silva, E.B., Fontes, M.P.F., Liu, X., & Ma, L.Q. (2018). Speciation, bioaccessibility and potential risk of chromium in Amazon forest soils. Environmental Pollution, 239, 384-391. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.025

Morman, S.A., Plumlee, G.S., & Smith, D.B. (2009). Application of *in vitro* extraction studies to evaluate element bioaccessibility in soils from a transect across the United States and Canada. Applied Geochemistry, 24, 1454-1463. <u>https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2009.04.015</u>

MTES. (2017). Méthodologie nationale de gestion des sites et sols pollués. Ministère de l'Environnement, de l'Enrgie et de la Mer.

Nagar, R., Sarkar, D., Makris, K.C., Datta, R., & Sylvia, V.L. (2009). Bioavailability and Bioaccessibility of Arsenic in a Soil Amended with Drinking-Water Treatment Residuals. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 57, 755-766. <u>https://doi.org/10.1007/s00244-009-9318-7</u>

Ng, J.C., Juhasz, A., Smith, E., & Naidu, R. (2015). Assessing the bioavailability and bioaccessibility of metals and metalloids. Environmental Science and Pollution Research, 22, 8802-8825. <u>https://doi.org/10.1007/s11356-013-1820-9</u>

Ning, Z., Liu, E., Yao, D., Xiao, T., Ma, L., Liu, Y., Li, H., & Liu, C. (2021). Contamination, oral bioaccessibility and human health risk assessment of thallium and other metal(loid)s in farmland soils around a historic TI-Hg mining area. Science of The Total Environment, 758, 143577. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143577</u>

Niyommaneerat, W., & Aung, N.N. (2010). The oral bioaccessibility of heavy metals in soil in a contaminated area in Thailand. 2010 International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, 276-280. https://doi.org/10.1109/ICCCENG.2010.5560435

Oomen, A.G., Brandon, E.F.A., Swartjes, F.A., Lijzen, J.P.A., & Sips, A.J.A.M. (2006). How Can Information on Oral Bioavailability Improve Human Health Risk Assessment for Lead-contaminated Soils? Implementation and Scientific Basis: RIVM Report, 108. <u>https://doi.org/10.1097/00001648-200611001-00065</u>

Oomen, A.G., Hack, A., Minekus, M., Zeijdner, E., Cornelis, C., Schoeters, G., Verstraete, W., Van de Wiele, T., Wragg, J., Rompelberg, C.J.M., Sips, A.J.A.M., & Van Wijnen, J.H. (2002). Comparison of Five *In vitro* Digestion Models To Study the Bioaccessibility of Soil Contaminants. Environmental Science & Technology, 36, 3326-3334. https://doi.org/10.1021/es010204v Oomen, A.G., Rompelberg, C.J.M., Bruil, M.A., Dobbe, C.J.G., Pereboom, D.P.K.H., & Sips, A.J.A.M. (2003). Development of an *In vitro* Digestion Model for Estimating the Bioaccessibility of Soil Contaminants. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 44, 281-287. <u>https://doi.org/10.1007/s00244-002-1278-0</u>

Palmer, S., Ofterdinger, U., McKinley, J. M., Cox, S., & Barsby, A. (2013). Correlation analysis as a tool to investigate the bioaccessibility of nickel, vanadium and zinc in Northern Ireland soils. Environmental Geochemistry and Health, 35, 569-584. <u>https://doi.org/10.1007/s10653-013-9540-0</u>

Pascaud, G., Leveque, T., Soubrand, M., Boussen, S., Joussein, E., & Dumat, C. (2014). Environmental and health risk assessment of Pb, Zn, As and Sb in soccer field soils and sediments from mine tailings: Solid speciation and bioaccessibility. Environmental Science and Pollution Research, 21, 4254-4264. <u>https://doi.org/10.1007/s11356-013-2297-2</u>

Paustenbach, D.J. (2000). The Practive Of Exposure Assessment: A State-Of-The-Art Review. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, 3, 179-291. <u>https://doi.org/10.1080/10937400050045264</u>

Pelfrêne, A., Waterlot, C., Mazzuca, M., Nisse, C., Bidar, G., & Douay, F. (2011). Assessing Cd, Pb, Zn human bioaccessibility in smelter-contaminated agricultural topsoils (northern France). Environmental Geochemistry and Health, 33, 477-493. <u>https://doi.org/10.1007/s10653-010-9365-z</u>

Pelfrêne, A., Waterlot, C., Mazzuca, M., Nisse, C., Cuny, D., Richard, A., Denys, S., Heyman, C., Roussel, H., Bidar, G., & Douay, F. (2012). Bioaccessibility of trace elements as affected by soil parameters in smelter-contaminated agricultural soils: A statistical modeling approach. Environmental Pollution, 160, 130-138. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.09.008

Pereira, W.V. da S., Teixeira, R.A., de Souza, E.S., de Moraes, A.L.F., Campos, W.E.O., do Amarante, C.B., Martins, G.C., & Fernandes, A.R. (2020). Chemical fractionation and bioaccessibility of potentially toxic elements in area of artisanal gold mining in the Amazon. Journal of Environmental Management, 267, 110644. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110644

Pettine, M., & Capri, S. (2005). Digestion treatments and risks of Cr(III)–Cr(VI) interconversions during Cr(VI) determination in soils and sediments—A review. Analytica Chimica Acta, 540, 231-238. https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.03.040

Poggio, L., Vrščaj, B., Schulin, R., Hepperle, E., & Ajmone Marsan, F. (2009). Metals pollution and human bioaccessibility of topsoils in Grugliasco (Italy). Environmental Pollution, 157, 680-689. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.08.009

Raj, D., & Maiti, S.K. (2020). Sources, bioaccumulation, health risks and remediation of potentially toxic metal(loid)s (As, Cd, Cr, Pb and Hg): An epitomised review. Environmental Monitoring and Assessment, 192, 108. https://doi.org/10.1007/s10661-019-8060-5

Rinklebe, J., & Shaheen, S.M. (2017). Redox chemistry of nickel in soils and sediments: A review. Chemosphere, 179, 265-278. <u>https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.153</u>

Rodrigues, S.M., Coehlo, C., Cruz, N., Monteiro, R.J.R., Henriques, B., Duarte, A.C., Römkens, P.F.A.M., & Pereira, E. (2014). Oral bioaccessibility and human exposure to anthropogenic and geogenic mercury in urban, industrial and mining areas. Science of the Total Environment, 496, 649-661. http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.115

Rodrigues, S. M., Cruz, N., Coelho, C., Henriques, B., Carvalho, L., Duarte, A.C., Pereira, E., & Römkens, P.F.A.M. (2013). Risk assessment for Cd, Cu, Pb and Zn in urban soils : Chemical availability as the central concept. Environmental Pollution, 183, 234-242. <u>https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.10.006</u>

Rodriguez, R.R., Basta, N.T., Casteel, S. W., & Pace, L. W. (1999). An *In vitro* Gastrointestinal Method To Estimate Bioavailable Arsenic in Contaminated Soils and Solid Media. Environmental Science & Technology, 33, 642-649. <u>https://doi.org/10.1021/es980631h</u> Roussel, H., Waterlot, C., Pelfrêne, A., Pruvot, C., Mazzuca, M., & Douay, F. (2010). Cd, Pb and Zn Oral Bioaccessibility of Urban Soils Contaminated in the Past by Atmospheric Emissions from Two Lead and Zinc Smelters. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 58, 945-954. https://doi.org/10.1007/s00244-009-9425-5

Ruby, M.V., Davis, A., Schoof, R., Eberle, S., & Sellstone, C.M. (1996). Estimation of Lead and Arsenic Bioavailability Using a Physiologically Based Extraction Test. Environmental Science & Technology, 30, 422-430. https://doi.org/10.1021/es950057z

Ruby, M.V., & Lowney, Y.W. (2012). Selective Soil Particle Adherence to Hands: Implications for Understanding Oral Exposure to Soil Contaminants. Environmental Science & Technology, 46, 12759-12771. https://doi.org/10.1021/es302473q

Ruby, M.V., Schoof, R., Brattin, W., Goldade, M., Post, G., Harnois, M., Mosby, D.E., Casteel, S.W., Berti, W., Carpenter, M., Edwards, D., Cragin, D., & Chappell, W. (1999). Advances in Evaluating the Oral Bioavailability of Inorganics in Soil for Use in Human Health Risk Assessment. Environmental Science & Technology, 33, 3697-3705. https://doi.org/10.1021/es990479z

Sanderson, P., Naidu, R., Bolan, N., Bowman, M., & Mclure, S. (2012). Effect of soil type on distribution and bioaccessibility of metal contaminants in shooting range soils. Science of The Total Environment, 438, 452-462. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.08.014

Sarkar, D., Makris, K.C., Parra-Noonan, M.T., & Datta, R. (2007). Effect of soil properties on arsenic fractionation and bioaccessibility in cattle and sheep dipping vat sites. Environment International, 33, 164-169. https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.09.004

Schroder, J.L., Basta, N.T., Casteel, S.W., Evans, T.J., Payton, M.E., & Si, J. (2004). Validation of the *In vitro* Gastrointestinal (IVG) Method to Estimate Relative Bioavailable Lead in Contaminated Soils. Journal of Environmental Quality, 33, 513-521. <u>https://doi.org/10.2134/jeq2004.5130</u>

Schroder, J.L., Basta, N.T., Si, J., Casteel, S.W., Evans, T., & Payton, M. (2003). *In vitro* Gastrointestinal Method To Estimate Relative Bioavailable Cadmium in Contaminated Soil. Environmental Science & Technology, 37, 1365-1370. <u>https://doi.org/10.1021/es026105e</u>

Selinus, O., Alloway, B., Centeno, J., Finkelman, R., Fuge, R., Lindh, U., & Smedley, P. (Eds.). (2013). Essentials of Medical Geology: Revised Edition (Springer). Springer Netherlands. <u>https://doi.org/10.1007/978-94-007-4375-5</u>

Semple, K.T., Doick, K.J., Jones, K.C., Burauel, P., Craven, A., & Harms, H. (2004). Defining Bioavailability and Bioaccessibility of Contaminated Soil and Sediment is Complicated. Environmental Science & Technology, 38, 228A-231A. <u>https://doi.org/10.1021/es040548w</u>

Sialelli, J., Davidson, C.M., Hursthouse, A.S., & Ajmone-Marsan, F. (2011). Human bioaccessibility of Cr, Cu, Ni, Pb and Zn in urban soils from the city of Torino, Italy. Environmental Chemistry Letters, 9, 197-202. https://doi.org/10.1007/s10311-009-0263-5

Sintorini, M.M., Widyatmoko, H., Sinaga, E., & Aliyah, N. (2021). Effect of pH on metal mobility in the soil. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 737, 012071. <u>https://doi.org/10.1088/1755-1315/737/1/012071</u>

Smith, E., Scheckel, K., Miller, B.W., Weber, J., & Juhasz, A.L. (2014). Influence of *in vitro* assay pH and extractant composition on As bioaccessibility in contaminated soils. Science of the Total Environment, 473-474, 171-177. <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.030</u>

Stevens, B., Betts, A., Miller, B.W., Scheckel, K.G., Anderson, R.H., Bradham, K.D., Casteel, S.W., Thomas, D.J., & Basta, N.T. (2018). Arsenic speciation of contaminated soils/solid wastes and relative oral bioavailability in swine and mice. Soil Systems, 2, 27. <u>https://doi.org/10.3390/soilsystems2020027</u>

Stewart, M.A., Jardine, P.M., Barnett, M.O., Mehlhorn, T.L., Hyder, L.K., & McKay, L.D. (2003a) Influence of Soil Geochemical and Physical Properties on the Sorption and Bioaccessibility of Chromium(III). Journal of Environmental Quality, 32, 129-137. https://doi.org/10.2134/jeq2003.1290

Stewart, M.A., Jardine, P.M., Brandt, C.C., Barnett, M.O., Fendorf, S.E., McKay, L.D., Mehlhorn, T.L., & Paul, K. (2003b). Effects of Contaminant Concentration, Aging, and Soil Properties on the Bioaccessibility of Cr(III) and Cr(VI) in Soil. Soil and Sediment Contamination: An International Journal, 12, 1-21. https://doi.org/10.1080/713610958

Tang, X., Zhu, Y., Cui, Y., Duan, J., & Tang, L. (2006). The effect of ageing on the bioaccessibility and fractionation of cadmium in some typical soils of China. Environment International, 32, 682-689. https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.03.003

Tian, H., Wang, Y., Xie, J., Li, H., & Zhu, Y. (2020). Effects of Soil Properties and Land Use Types on the Bioaccessibility of Cd, Pb, Cr, and Cu in Dongguan City, China. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 104, 64-70. <u>https://doi.org/10.1007/s00128-019-02740-9</u>

Toujaguez, R., Ono, F.B., Martins, V., Cabrera, P.P., Blanco, A.V., Bundschuh, J., & Guilherme, L.R.G. (2013). Arsenic bioaccessibility in gold mine tailings of Delita, Cuba. Journal of Hazardous Materials, 262, 1004-1013. <u>https://doi.org/10.1016/i.jhazmat.2013.01.045</u>

US EPA. (1989). Risk Assessment Guidance for Superfund (RAGS), Volume I, Human Health Evaluation Manual (Part A). U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC: Office of Emergency and Remedial Response, EPA/540/1-89/002.

US EPA. (2000). Short Sheet: TRW Recommendations for Sampling and Analysis of Soil at Lead (Pb) Sites. Washington, DC. Available at: https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/901X0H00.TXT?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=2000+Thru+ 2005&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QField Year=&QFieldMonth=&QFieldDay=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=.

US EPA. (2002). Supplemental guidance for developing soil screening levels for superfund sites (OSWER 9355.4-24; p. 187). United States Environmental Protection Agency.

US EPA. (2007). Guidance for Evaluating the Oral Bioavailability of Metals in Soils for Use in Human Health Risk Assessment (OSWER 9285.7-80). United States Environmental Protection Agency.

US EPA. (2012a). Recommendations for default value for relative bioavailability of arsenic in soil (OSWER 9200.1-113). Available online at <u>https://semspub.epa.gov/work/HQ/175338.pdf</u>.

US EPA. (2012b). Standard Operating Procedure for an *In vitro* Bioaccessibility Assay for Lead in Soil (EPA 9200.2-86). United States Environmental Protection Agency.

US EPA. (2016). Recommendations for sieving soil and dust samples at lead sites for assessment of incidental ingestion (ELEM 9200.1-129). Available online at <u>https://semspub.epa.gov/work/HQ/100000133.pdf</u>.

US EPA. (2017a). Method 1340 (SW-846 Update VI). United States Environmental Protection Agency.

US EPA. (2017b). Standard Operating Procedure for an *In vitro* Bioaccessibility Assay for Lead and Arsenic in Soil (OLEM 9200.2-164). United States Environmental Protection Agency.

US EPA. (2021). Guidance for Sample Collection for *In vitro* Bioaccessibility Assay for Arsenic and Lead in Soil and Applications of Relative Bioavailability Data in Human Health Risk Assessment. United States Environmental Protection Agency.

Van de Wiele, T.R., Oomen, A.G., Wragg, J., Cave, M., Minekus, M., Hack, A., Cornelis, C., Rompelberg, C. J. M., De Zwart, L.L., Klinck, B., Van Wijnen, J., Verstraete, W., & Sips, A. J. A. M. (2007). Comparison of five *in vitro*
digestion models to *in vivo* experimental results: Lead bioaccessibility in the human gastrointestinal tract. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 42, 1203-1211. <u>https://doi.org/10.1080/10934520701434919</u>

Van der Kallen, C.C., Gosselin, M., & Zagury, G.J. (2020). Oral and inhalation bioaccessibility of metal(loid)s in chromated copper arsenate (CCA)-contaminated soils: Assessment of particle size influence. Science of The Total Environment, 734, 139412. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139412</u>

Vasiluk, L., Sowa, J., Sanborn, P., Ford, F., Dutton, M.D., & Hale, B. (2019). Bioaccessibility estimates by gastric SBRC method to determine relationships to bioavailability of nickel in ultramafic soils. Science of The Total Environment, 673, 685-693. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.059</u>

Vasques, I.C.F., Lima, F.R.D., Oliveira, J.R., de Morais, E.G., Pereira, P., Guilherme, L.R.G., Marques, J.J. (2020). Comparison of bioaccessibility methods in spiked and field Hg-contaminated soils. Chemosphere, 254, 126904. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126904

Wang, C.-C., Zhang, Q.-C., Kang, S.-G., Li, M.-Y., Zhang, M.-Y., Xu, W.-M., Xiang, P., & Ma, L. Q. (2023a). Heavy metal(loid)s in agricultural soil from main grain production regions of China: Bioaccessibility and health risks to humans. Science of The Total Environment, 858, 159819. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159819</u>

Wang, H., Yang, Q., Zhu, Y., Gu, Q., & Martín, J.D. (2023b). Speciation, *in vitro* bioaccessibility and health risk of antimony in soils near an old industrial area. Science of The Total Environment, 854, 158767. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158767</u>

Wang, Y.-L., Tsou, M.-C., Liao, H.-T., Hseu, Z.-Y., Dang, W., Hsi, H.-C., & Chien, L.-C. (2020). Influence of soil properties on the bioaccessibility of Cr and Ni in geologic serpentine and anthropogenically contaminated non-serpentine soils in Taiwan. Science of The Total Environment, 714, 136761. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136761

Welfringer, B., Zagury, G.J. (2009). Evaluation of two *in vitro* protocols for determination of mercury bioaccessibility: influence of mercury fractionation and soil properties. Journal of Environmental Quality, 38, 2237-2244. <u>https://doi.org/10.2134/jeq2008.0478</u>

Wilson, S.C., Lockwood, P.V., Ashley, P.M., & Tighe, M. (2010). The chemistry and behaviour of antimony in the soil environment with comparisons to arsenic: A critical review. Environmental Pollution, 158, 1169-1181. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.10.045

Whitacre, S.D., Basta, N.T., Stevens, B.N., Hanley, V., Anderson, R.H., & Scheckel, K.G. (2017). Modification of an existing *in vitro* method to predict relative bioavailable arsenic in soils. Chemosphere, 180, 545-552. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.03.134

Wolf, R.E., Morrison, J.M., & Goldhaber, M.B. (2007). Simultaneous determination of Cr(III) and Cr(VI) using reversed-phased ion-pairing liquid chromatography with dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 22, 1051. <u>https://doi.org/10.1039/b704597b</u>

Wragg, J., Cave, M., Basta, N., Brandon, E., Casteel, S., Denys, S., Gron, C., Oomen, A., Reimer, K., Tack, K., & Van de Wiele, T. (2011). An inter-laboratory trial of the unified BARGE bioaccessibility method for arsenic, cadmium and lead in soil. Science of The Total Environment, 409, 4016-4030. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.05.019

Wragg, J., Cave, M.R., & Environment Agency. (2003). In-vitro methods for the measurement of the oral bioaccessibility of selected metals and metalloids in soils: A review of guidance and selected industry practices. Environment Agency.

Xia, Q., Peng, C., Lamb, D., Mallavarapu, M., Naidu, R., & Ng, J. C. (2016). Bioaccessibility of arsenic and cadmium assessed for *in vitro* bioaccessibility in spiked soils and their interaction during the Unified BARGE Method (UBM) extraction. Chemosphere, 147, 444-450. <u>https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.12.091</u>

Xia, X., Xiang, X., Yazhi, T., Fanglei, S., Baochen, L., Yefang, S., & Zhang, H. (2022). Bioaccessibility of Metals in Soils at Typical Legacy Industrial Sites : *In vitro* Evaluation Using Physiologically-Based Extraction. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 109, 578-584. <u>https://doi.org/10.1007/s00128-022-03468-9</u>

Yamamoto, N., Takahashi, Y., Yoshinaga, J., Tanaka, A., & Shibata, Y. (2006). Size Distributions of Soil Particles Adhered to Children's Hands. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 51, 157-163. https://doi.org/10.1007/s00244-005-7012-y

Yan, K., Dong, Z., Wijayawardena, M.A.A., Liu, Y., Li, Y., & Naidu, R. (2019). The source of lead determines the relationship between soil properties and lead bioaccessibility. Environmental Pollution, 246, 53-59. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.104

Yang, J.Y., Yang, X.E., He, Z.L., Li, T.Q., Shentu, J.L., & Stoffella, P.J. (2006). Effects of pH, organic acids, and inorganic ions on lead desorption from soils. Environmental Pollution, 143, 9-15. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.11.010

Yang, J.-K., Barnett, M.O., Jardine, P.M., Basta, N.T., & Casteel, S.W. (2002). Adsorption, Sequestration, and Bioaccessibility of As(V) in Soils. Environmental Science & Technology, 36, 4562-4569. https://doi.org/10.1021/es011507s

Yang, K., Zhang, T., Shao, Y., Tian, C., Cattle, S. R., Zhu, Y., & Song, J. (2018). Fractionation, Bioaccessibility, and Risk Assessment of Heavy Metals in the Soil of an Urban Recreational Area Amended with Composted Sewage Sludge. International Journal of Environmental Research and Public Health, 15, 613. https://doi.org/10.3390/ijerph15040613

Yin, N., Zhao, Y., Wang, P., Du, H., Yang, M., Han, Z., Chen, X., Sun, G., & Cui, Y. (2021). Effect of gut microbiota on *in vitro* bioaccessibility of heavy metals and human health risk assessment from ingestion of contaminated soils. Environmental Pollution, 279, 116943.

Yu, S., Du, J., Luo, T., Huang, Y., & Jing, C. (2012). Evaluation of chromium bioaccessibility in chromite ore processing residue using *in vitro* gastrointestinal method. Journal of Hazardous Materials, 209-210, 250-255. <u>https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.01.009</u>

Zapusek, U., & Lestan, D. (2009). Fractionation, mobility and bio-accessibility of Cu, Zn, Cd, Pb and Ni in aged artificial soil mixtures. Geoderma, 154, 164-169. <u>https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2009.10.012</u>

Zhitkovich, A. (2005). Importance of Chromium–DNA Adducts in Mutagenicity and Toxicity of Chromium(VI). Chemical Research in Toxicology, 18, 3-11. <u>https://doi.org/10.1021/tx049774+</u>

Zhong, M., & Jiang, L. (2017). Refining health risk assessment by incorporating site-specific background concentration and bioaccessibility data of Nickel in soil. Science of The Total Environment, 581-582, 866-873. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.036</u>

Zhou, Y.F., & Haynes, R.J. (2010). Sorption of heavy metals by inorganic and organic components of solid wastes: Significance to use of wastes as low-cost adsorbents and immobilizing agents. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 40(11), 909-977. <u>https://doi.org/10.1080/10643380802586857</u>

Zhu, X., Yang, F., Wei, C., & Liang, T. (2016). Bioaccessibility of heavy metals in soils cannot be predicted by a single model in two adjacent areas. Environmental Geochemistry and Health, 38, 233-241. https://doi.org/10.1007/s10653-015-9711-2

Ziegler, E.E., Edwards, B.B., Jensen, R.L., Mahaffey, K.R., & Fomon, S.J. (1978). Absorption and Retention of Lead by Infants. Pediatric Research, 12, 29-34. <u>https://doi.org/10.1203/00006450-197801000-00008</u>

Zingaretti, D., & Baciocchi, R. (2021). Different Approaches for Incorporating Bioaccessibility of Inorganics in Human Health Risk Assessment of Contaminated Soils. Applied Sciences, 11, 3005.

1.1.2. Bilan de l'état de l'art

Un grand nombre d'études prend en compte la BAc orale des EM dans les sols pour affiner l'évaluation de l'exposition de l'Homme et intègre ce paramètre dans les calculs de risques.

De nombreux tests *in vitro* ont été développés à l'échelle internationale pour estimer la BAc orale des EM dans les sols. Toutefois, bien qu'ils soient largement utilisés pour d'autres EM à l'heure actuelle, la plupart des tests n'ont été validés par un modèle *in vivo* que pour l'As et le Pb, et dans une moindre mesure pour le Cd. Certaines études vont jusqu'à l'intégration de la BAc des EM dans les calculs de risques pour lesquels les tests de BAc n'ont pas été validés en comparaison à un modèle *in vivo*.

Cette étude souligne le besoin de disposer de tests validés pour d'autres EM afin de correctement prendre en compte la BAc dans les évaluations des risques sanitaires.

D'une manière générale, les gammes de BAc pour l'As, le Cd et le Pb sont plus variables et plus élevées (jusqu'à 100% dans la phase G) que celles pour le Cr, le Ni et le Sb : ces derniers ont tendance à avoir des valeurs de BAc généralement <20%.

Selon la littérature, les paramètres physico-chimiques des sols (comme le pH, les teneurs en carbonates, en matière organique, en oxydes...), les concentrations totales des EM et leurs formes chimiques influent leur BAc gastrique (G) et gastro-intestinale (GI); néanmoins, les paramètres expliquant la BAc des EM du sol varient d'une étude à l'autre pour un même EM. La prédiction de la BAc sur la base d'équations utilisant la concentration totale de contaminants dans les sols ainsi que des paramètres physico-chimiques est possible mais, ces équations ont tendance à être dépendantes aux données de l'étude et non généralisables à tous les sols.

Les mécanismes liants les paramètres physico-chimiques à la BAc sont complexes car leur influence a tendance à être multifactorielle, mais leur étude reste importante pour comprendre les mécanismes régissant la BAc ce qui pourrait *in fine* aider à une meilleure gestion des SSP.

Pour un même sol étudié, les BAc peuvent être différentes selon le test *in vitro* utilisé, ces derniers ayant notamment des protocoles de préparation des échantillons différents (tamisage, broyage, taille de la fraction) ainsi que des protocoles de caractérisation des bioaccessibilités gastrique et gastrointestinale différents (composition des solutions digestives, pH des compartiments, temps de résidence). Des critères de validation *in vitro/in vivo* (IVIV) ont été définis pour assurer la validité des test *in vitro* de bioaccessibilité.

57

Au regard des différences entre les protocoles, il est compliqué de se risquer à des comparaisons de méthodes. Cependant, lors du choix de la méthode, il est recommandé d'utiliser un test *in vitro* respectant le plus les critères de validation IVIV (e.g., Method 1340 de l'US EPA, PBET, UBM, RIVM, CAB et IVG).

Il existe des disparités entre les méthodes et recommandations d'intégration de la BAc dans les ERS, et ce malgré l'existence de guides dans certains pays. La bioaccessibilité est parfois intégrée telle quelle dans les calculs de risques sans prendre en considération d'éventuels ajustements proposés par certaines méthodes et recommandations.

Ces observations soulignent l'importance de proposer des recommandations opérationnelles aux utilisateurs de la bioaccessibilité en vue d'harmoniser les pratiques.

1.2. Utilisation de la bioaccessibilité orale des EM en France

En France, la méthodologie nationale de la gestion des sites et sols pollués (MTES, 2017) cadre l'utilisation de la bioaccessibilité dans les deux démarches de gestion : l'Interprétation de l'Etat des Milieux (IEM) et le Plan de Gestion (PG). Elle recommande l'utilisation du test UBM (Unified Bioaccessibility Method ; ISO 19724:2019), validé au regard d'un modèle *in vivo* (porcelet) pour l'As, le Cd et le Pb (Caboche, 2009 ; Denys et al., 2012), la démarche actuelle d'intégration dans les ERS étant mentionnée dans le rapport InVS-Ineris (2012). Seulement, ce test est peu ou pas utilisé par les acteurs de la gestion des SSP (maîtres d'ouvrage, bureaux d'études...). Les raisons sont multiples :

- une méconnaissance de la thématique : notions de bioaccessibilité/biodisponibilité, démarche d'intégration dans les évaluations des expositions et des risques ;
- son accessibilité : seul un nombre limité de laboratoires commerciaux d'analyses le propose en raison de sa complexité et du nombre important de réactifs nécessaires ;
- le coût relativement élevé du test UBM ;
- les modalités d'intégration de la BAc dans les calculs de risques (InVS-Ineris, 2012) restreignent
 l'utilisation de la BAc du Pb dès lors que sa BAc est supérieure à 50% (cf. facteur 2 d'ajustement).

Actuellement, le test UBM est validé par une comparaison IVIV pour trois EM : As, Cd, Pb (Denys et al., 2012 ; Caboche, 2009). Même s'il s'agit des EM parmi les plus couramment rencontrés dans les études de gestion des SSP pouvant conduire à des risques sanitaires significatifs, il parait intéressant d'étendre la validité du test UBM à de nouveaux EM. Lors des travaux de Caboche (2009), le Sb avait

également été considéré. Néanmoins, ses faibles biodisponibilités et BAc n'ont pas rendu possible la validation IVIV du test UBM pour cet élément (Caboche, 2009). Le Cr, particulièrement le Cr VI, et le Ni sont également susceptibles d'engendrer des risques sanitaires lors de la prise en compte des concentrations totales. Il a été observé dans la littérature que leur BAc tend à être relativement faible (<20% pour Cr et <30% pour Ni généralement ; Billmann et al., 2023). Ainsi, la prise en compte de leur biodisponibilité au travers de la mesure de la BAc pourrait être une véritable plus-value lors de l'évaluation de l'exposition de l'Homme.

Pour répondre à la complexité du test UBM et à son coût élevé dès lors qu'il y a de nombreux échantillons à analyser, un test simplifié a été développé (Pelfrêne et al., 2020). Ce test, avec un extractant simple (HCl dilué à 0,65% v/v), est rapide et peu coûteux. De très bonnes corrélations avec le test UBM ont été obtenues permettant ainsi de prédire la BAc orale pour l'As, le Cd et le Pb. Ainsi, ce test peut être utilisé en première approche sur un grand nombre d'échantillons en tant que méthode de screening. Son utilisation sur d'autres EM pourrait s'avérer également intéressante.

Au niveau national, une démarche a été proposée en 2012 pour intégrer la BAc dans le calcul de la dose journalière d'exposition (DJE), spécifiquement pour As, Cd et Pb (InVS-Ineris, 2012). Elle propose des facteurs d'ajustement de la BAc pour approcher la biodisponibilité relative (RBA), paramètre qui est intégré dans le calcul de la DJE. Pour l'As et le Cd, à la suite de simplifications, la BAc absolue peut être intégrée directement à la place de la RBA. En ce qui concerne le Pb, la méthodologie implique la prise en compte d'un facteur 2 à la BAc absolue du Pb lors de l'ajustement, ce qui limite l'utilisation de la BAc dès lors que les valeurs dépassent les 50%. Par ailleurs, le test UBM simule deux phases : la phase G qui a tendance à extraire plus d'EM, et la phase GI qui est la phase la plus réaliste physiologiquement car l'absorption se déroule majoritairement dans les intestins (RIVM, 2000). Malgré la recommandation de considérer de manière sécuritaire la phase ayant la BAc la plus élevée ou celle qui présente la meilleure corrélation avec la fraction biodisponible (InVS-Ineris, 2012), des confusions persistent car ces recommandations ne semblent pas claires pour les acteurs des SSP et conduisent à des interprétations différentes ; la bioaccessibilité la plus élevée étant cependant la pratique la plus couramment retenue actuellement.

Dans la gestion des SSP, les données de BAc sont généralement obtenues à un instant donné pour répondre à un besoin en lien avec un usage actuel ou futur. Cependant, le suivi de la bioaccessibilité lors de modifications des sols (apport d'amendements par exemple) n'est que peu étudié actuellement dans la littérature et pas ou peu intégré dans les études SSP. De plus, le sol est un milieu complexe, et les processus de pédogénèse au cours du temps peuvent modifier la spéciation, la distribution et la mobilité des EM et donc leur BAc. Ainsi, la BAc ou l'effet de l'apport d'amendements sur la BAc des EM peuvent évoluer au fil des années. En termes de modes de gestion, les amendements sont utilisés dans la littérature pour leur capacité à réduire la mobilité et la BAc des

59

EM présents dans les sols ainsi que pour leurs propriétés agronomiques. C'est notamment le cas du compost utilisé par les jardiniers et du biochar utilisé par certains acteurs des SSP. Se posent donc des questions concernant l'évolution de la BAc au cours du temps sans ou avec apports d'amendements.

1.3. Bilan et objectifs de la thèse

D'après l'étude de la bibliographie, la BAc est un outil largement reconnu pour affiner l'estimation de l'exposition de l'Homme aux EM en lien avec l'ingestion non intentionnelle de particules de sols. Mais des points d'attention et des axes d'amélioration ont été identifiés afin d'homogénéiser les pratiques allant de la préparation des échantillons, en passant par la détermination de la BAc jusqu'à son intégration dans les calculs de risques. Afin de promouvoir l'utilisation de la BAc en France, cette thèse porte sur l'amélioration des ERS par l'utilisation de la BAc comme outil de caractérisation des expositions de l'Homme aux EM.

Dans cet objectif, plusieurs questions se posent :

- Quelle est la plus-value de l'utilisation de la bioaccessibilité des EM (As, Cd, Cr, Ni, Pb et Sb) pour évaluer l'exposition des populations en comparaison des concentrations totales ? Quels sont les facteurs d'influence de la bioaccessibilité ?
- Le test UBM peut-il être étendu et validé à d'autres EM ?
- o Comment prendre en compte la bioaccessibilité dans les calculs de risques sanitaires ?

Pour y répondre, deux phases expérimentales ont été mises en place et sont présentées dans le schéma de synthèse (Figure 3) :

- L'objectif de la première est de s'intéresser notamment au Cr (sous ses formes trivalente et hexavalente) et au Ni afin (i) d'évaluer leur BAc dans des sols présentant une variabilité en termes de sources, d'origines de contamination, de degrés de contamination et de paramètres physico-chimiques (Chapitre 3.1) ; (ii) d'étudier l'influence de la matrice du sol, de la spéciation (cas du Cr), de l'apport ou pas d'amendement (compost, biochar) et de la temporalité sur la bioaccessibilité des EM (Chapitre 3.2) ; et (iii) d'étudier la validité du test *in vitro* UBM pour Cr et Ni, au regard du modèle porcelet, mais aussi la méthode simplifiée à l'HCl (Chapitre 3.3) ;
- L'objectif de la seconde phase expérimentale est (i) d'apporter des éléments de réponse quant à l'intégration de la BAc dans les calculs de risques (Chapitre 4.1) ; et (ii) d'étudier l'application de la BAc à travers de sites pilotes d'Ile-de-France (Chapitre 4.2).



Figure 3. Schéma de synthèse des méthodes mises en œuvre

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

Ce chapitre présente la méthodologie mise en œuvre pour répondre aux questions scientifiques posées dans ces travaux de thèse, à savoir la possibilité de valider le test *in vitro* UBM pour d'autres EM, l'évolution temporelle de la bioaccessibilité avec et sans apport d'amendements (compost, biochar) et la prise en compte de la bioaccessibilité de manière opérationnelle dans les calculs des risques sanitaires. Pour cela, deux lots de sols ont été constitués (Figure 4) : le Lot 1, composé d'échantillons de sols multi-contaminés et contenant notamment du Cr et du Ni, a servi à évaluer la BAc de ces deux nouveaux éléments et à étudier la validation de la méthode par comparaison *in vitro/in vivo* (IVIV) ; le Lot 2, constitué d'échantillons plus particulièrement contaminés au Pb provenant d'Ile-de-France, a servi à mettre en application l'utilisation de la bioaccessibilité sur un territoire pilote. Pour ces deux lots, sont présentés les méthodes d'échantillonnage, la sélection des sols, les méthodes analytiques et de traitement statistique. Les essais *in vivo* ainsi que la préparation des matrices biologiques ont été réalisés dans le cadre de la thèse en cours de Ronagul TURGANOVA au sein de l'Animalerie du Campus de Biologie et de Santé (ACBS) du L2A de l'Université de Lorraine.



Figure 4. Démarche expérimentale proposée pour répondre aux objectifs de la thèse

2.1. Sélection des sols

2.1.1. Collecte des échantillons du Lot 1

Des échantillons de sols présentant une large gamme de concentrations totales (pseudo-totales) en Cr et en Ni (allant de quelques dizaines de mg kg⁻¹ à des concentrations > 10 000 mg kg⁻¹) ont été recherchés dans le but d'être représentatifs des concentrations rencontrées dans différents contextes (anthropiques et géogènes), d'avoir des historiques diverses ainsi qu'une grande variabilité en termes de paramètres physico-chimiques des sols.

Au total, 34 échantillons de sol ont été collectés et proviennent de France métropolitaine (n=26), de Belgique (n=1), d'Irlande du Nord (n=2), de Grèce (n=2) et des DROM (Réunion et Nouvelle-Calédonie ; n=4) et sont présentés dans le Tableau 8. Ces sols sont issus de contextes variés : sites industriels, friches urbaines, terril, zones urbaines, site ayant reçu des boues de station d'épuration des eaux usées (STEP) mais également de sites à fortes anomalies géologiques non anthropique. L'As, le Cd, le Pb et le Sb ont également été mesurés afin d'étudier la BAc de manière plus globale dans ce Lot 1.

Parmi ces 34 échantillons collectés, il s'est avéré après analyse que certains sols étaient trop faiblement contaminés en Cr et en Ni (< 50 mg kg⁻¹) ou trop similaires (e.g. même site et caractéristiques physico-chimiques) et ont été écartés de l'étude sur le Cr et le Ni mais ont été exploités lors de l'étude de la BAc des autres EM (As, Cd, Pb et Sb). Finalement, 27 sols ont été conservés pour l'étude de la BAc du Cr et du Ni.

Parmi ces 27 sols, 9 échantillons de sol représentatifs de sites contaminés en France et de certains pays européens ont été sélectionnés pour évaluer la biodisponibilité relative (RBA) du Cr et du Ni (Tableau 8). La représentativité de ces sols a été évaluée en considérant leur origine, leur degré de contamination ainsi que leurs paramètres physico-chimiques. Les concentrations totales en EM ont été prises en compte afin de construire des doses d'exposition permettant de concilier une contamination suffisamment élevée pour observer une réponse dans les organes mais suffisamment faible pour que cette réponse n'engendre pas d'effets indésirables aux porcelets avant l'expérimentation.

Finalement, ces 27 sols ont également servi à sélectionner 5 sols pour l'étude de la BAc du Cr et du Ni dans des sites multi-contaminés soumis à un vieillissement avec ou sans apport d'amendements (compost ou biochar). Les sols ont été sélectionnés de telle sorte à présenter des concentrations élevées en Cr et/ou Ni bioaccessibles ainsi que de Cr VI.

	Informations our		Echantillons considérés pour				Total mg kg ⁻¹						
Pays	l'origine de la contamination	ID	BAc Cr Ni	BAc autres EM	Essais in vivo	Vieillissement / Amendements	Cr	Cr VI	Ni	As	Cd	Pb	Sb
Belgique	Site métallurgique	B1	Х	Х	Х		374	0,1	238	79	12	668	29
	Ancion sito sidárurgique	MF1	Х	Х	Х	X (S2)	2902	391	41	18	1,4	369	55
		MF2	Х	Х			424	5	79	25	0,9	178	15
	Crassier	MF3	Х	Х	Х		2758	12	2044	87	5,2	142	203
	Zone boisée près d'une	MF4	Х	Х			653	<0,1	17	13	0,8	99	4,8
	ancienne usine de	MF5	Х	Х	Х	X (S4)	12175	745	98	5,0	0,8	3785	37
	chromage	MF6	Х	Х	Х		21079	1012	290	6,8	1,5	11511	59
		MF7	Х	Х		X (S5)	775	1,6	281	59	45	43664	89
		MF8	Х	Х			1220	68	1790	96	3,6	160	96
	Friche urbaine	MF9	Х	Х			717	0,8	830	73	2,7	158	18
		MF10	Х	Х			1019	16	447	58	21	18244	88
		MF11	Х	Х			1901	5,6	959	63	8,9	4029	129
		MF12	Х	Х			1020	3,2	850	69	2,7	1091	79
France		MF13	Х	Х			1887	17	2067	129	6,9	425	142
métropolitaine		MF26*			Х		777	nd	861	68	3,2	356	22
	Site industriel	MF14	Х	Х			157	1,3	51	9,8	1,8	263	16
		MF15	Х	Х		X (S3)	31	1,5	283	4,8	1,0	339	2,2
	Epandage boues de STEP	MF16	Х	Х	Х		42	0,1	451	4,5	219	103	1,7
	Terril	MF17	Х	Х		X (S1)	378	0,1	22	11	9,3	66	6,4
	Zone urbaine	MF18	Х	Х			159	2,3	44	35	9	527	20
		MF19		Х			36	0,4	24	94	1,8	385	10
		MF20		Х			41	0,1	18	16	1,6	147	5,4
		MF21		Х			32	0,1	29	5,9	0,8	41	2,1
		MF22		Х			33	0,1	19	13	1,7	714	7,5
		MF23		Х			52	0,6	35	143	4,1	113	11
		MF24		Х			58	0,5	69	140	5,2	129	13
		MF25		Х			65	1,1	34	135	17	375	16
France DROM	Gáogàna	FD1	х	Х			347	0,1	312	3,0	1,8	5,5	2,6
(Réunion)	Geogene	FD2	Х	Х			346	0,1	60	3,0	2,2	7,2	12
	Géogène	FD3	Х	Х	Х		18494	118	11663	3,3	5,8	12	247

Tableau 8. Concentrations totales en Cr, Ni, Cr VI et autres éléments métalliques des échantillons des sols du Lot 1

France DROM (Nouvelle Calédonie)		FD4	х	х			15522	17,3	7974	3,4	4,4	16	208
Grèce	Géogène - roches de	GR1	Х	Х			786	4,5	1732	5,5	1,1	12	14
	type serpentines	GR2	Х	Х	х		886	0,9	2356	5,2	1,3	16	17
Irlande du Nord	Géogène - roches	NI1	Х	Х			522	7,3	264	7,0	1,6	36	10
	basaltiques	NI2	Х	Х			502	0,9	385	14	1,8	57	11
		Total	27	34	9	5							

MF : France Métropolitaine ; FD : France DROM ; GR : Grèce ; NI : Irlande du Nord

S1-S5 : dénomination des échantillons dans l'étude du vieillissement sous ou sans apport d'amendements (compost, biochar)

*MF26 : mélange des sols MF7 à MF13 ; nd : non déterminé car mélange de sols à faibles teneurs en Cr VI

2.1.2. Collecte des échantillons du Lot 2

Une collecte de 45 échantillons de sols provenant de 23 sites d'Ile-de-France a été réalisée (Achères, Vincennes, Montreuil, Paris et Seine-Saint-Denis). Ils présentent des usages variés : pelouses de jardins publics (usage majoritaire), friches urbaines, jardins partagés, verger et un espace boisé (Tableau 9). Afin de minimiser l'incertitude sur la représentativité de l'échantillonnage des sols de surface, les échantillons ont été réalisés à partir de plusieurs sous-échantillons ponctuels (5 à 10 prélèvements) à des emplacements proches sur une zone donnée en carré pour réaliser un échantillon composite dont l'objectif est de représenter la composition moyenne d'une zone supposée homogène. Dans cette étude pilote, la profondeur de l'horizon d'échantillonnage (0-30 cm) a été sélectionnée par défaut. Dans les diagnostics des études ERS, les guides méthodologiques recommandent que les profondeurs échantillonnées soient cohérentes avec le schéma conceptuel (voie d'exposition, les usages et récepteurs) ("Diagnostics des sites et sols pollués version d'avril 2023" (MTECT, 2023)).

			_			
Reference	Usages	Pb total mg kg ⁻¹		Reference	Usages	Pb total mg kg ⁻¹
ACH1		160		PAR22		252
ACH2	Sol agricole/verger	289		PAR23	Pelouse Jardin public	577
PAR1	Sol de profondeur /	164		PAR24		94
PAR2	Pelouse proche aire de jeu	159		PAR25	Deleuse iandin nublia	84
PAR3	Jardins partagés	74		PAR26	Pelouse Jardin public	118
PAR4	Drairie (caus hais	138		PAR27		346
PAR5	Prairie / sous-bois	135		PAR28		467
PAR6	Friche urbaine	232		PAR29	Deleves isudia avalia	197
PAR7	Pelouse jardin public	396		PAR30	Pelouse Jardin public	105
PAR8	Espace boisé	324		PAR31	Pelouse jardin public	60
PAR9	Jardin cour intérieure	839		PAR32	Deleves isudia avalia	92
PAR10	Pelouse jardin public	199		PAR33	Pelouse Jardin public	58
PAR11	Pelouse jardin public	274		PAR34		185
PAR12		227		PAR35	Pelouse jardin public	444
PAR13	Deleves is adia avable	309		PAR36		86
PAR14	Pelouse Jardin public	211		PAR37	Pelouse jardin public	106
PAR15		187		PAR38	Dolouco iordin nublic	548
PAR16		197		PAR39	Pelouse jaruin public	161
PAR17	Polouso jardin public	269		SSD1		780
PAR18	Pelouse jaruin public	273		SSD2	Friche revégétalisée	106
PAR19		240		SSD3		57
PAR20	Polouso iardin public	299		VIN1	Pelouse jardin public	126
PAR21	reiouse jaruin public	2/19	-			

Tableau 9. Usages et concentrations totales en Pb des sols du Lot 2

ACH : Achères ; PAR : Paris ; SSD : Seine-Saint-Denis ; VIN : Vincennes

2.1.3. Préparation des échantillons de sols

A la réception au laboratoire, les échantillons de sols ont été séchés à 40°C en étuve puis tamisés à 2 mm. En fonction des analyses à réaliser, deux sous-échantillons ont été constitués pour subir les préparations suivantes :

- un tamisage à 250 μm au moyen d'une tamiseuse (AS200 Control, Retsch) en suivant les recommandations de la norme ISO 17924:2019 (comportant la caractérisation des concentrations totales et bioaccessibles) et du test simplifié HCl (ISO/DIS 7303);
- un broyage de la totalité de l'échantillon tamisé à 2 mm en vue de passer dans un tamis 250 μm en suivant les pratiques classiques de laboratoires d'analyses selon la norme pour la détermination des concentrations totales en contaminants du sol (NF ISO 11464, 2006).

Une partie a été conservée en <2 mm pour les déterminations de certains paramètres physicochimiques. Les échantillons ont été conservés dans des pots hermétiques en polypropylène à température ambiante.

2.2. Caractérisation physique et chimique des sols

2.2.1. Concentrations totales en EM

Les concentrations totales¹ en EM des sols des Lots 1 et 2 ont été obtenues par minéralisation à l'eau régale (6 mL HCl 37% et 2 mL HNO₃ 70%) de 0,4 g de sol séché et tamisé à 250 μ m en four micro-ondes fermé (NF ISO 13657). Les solutions de minéralisation du Lot 1 ont été analysées par spectrométrie d'émission optique à plasma à couplage inductif (ICP-OES) à l'Ineris. Les solutions de minéralisation du lot 2 ont été analysés par ICP-OES par le laboratoire d'Agronomie de la Ville de Paris.

Lors de l'analyse, une courbe d'étalonnage dont les concentrations en EM s'échelonnent de 0 à 10000 µg L⁻¹ en ICP-OES a été réalisée à partir de solutions multi-élémentaires diluées dans des matrices similaires aux solutions de digestion analysées. Un étalon de contrôle externe a été préparé à partir d'une autre solution multi-élémentaire à 50% de la concentration la plus élevée de la gamme afin de vérifier la justesse de la courbe d'étalonnage. Des contrôles de dérive (réinjection régulière de l'étalon à 50% de la concentration la plus élevée les 10 mesures. Avec

¹ La concentration totale correspond en réalité à la concentration pseudo-totale mais sera appelée totale dans l'ensemble du manuscrit par simplification. La minéralisation a été réalisée à l'eau régale, et il s'agit donc une dissolution pseudo-totale de la matrice du sol. Pour avoir la réelle concentration totale il aurait fallu réaliser des minéralisations à l'acide fluorhydrique. Le choix s'est porté vers l'eau régale pour des raisons d'homogénéité avec les méthodes classiques utilisées lors de la détermination des concentrations en contaminants par les acteurs des SSP ou lors des études de bioaccessibilité.

l'ICP-OES, une dérive de 15% est tolérée, au-delà des calculs d'ajustement des valeurs sont nécessaires. Les limites de quantification (LQ) sont vérifiées pour chaque série d'analyse en repassant les 1^{ers} points de la gamme en fin de série. La LQ est validée si elle correspond à la valeur cible ± 30%.

Tous les échantillons ont été minéralisés en triplicats, et un blanc et un matériau de référence certifié (SRM NIST2710a) ont été ajoutés à chaque série pour vérifier la qualité de la minéralisation. Les concentrations mesurées des EM dans le matériau de référence se situaient dans une gamme de variation inférieure à 20%.

2.2.2. Paramètres physico-chimiques des sols

Certains paramètres physico-chimiques des sols des lots 1 et 2 ont été mesurés selon les protocoles et normes présentés dans le Tableau 10. Ces paramètres ont été choisis car identifiés dans la littérature comme des paramètres pouvant influer sur la bioaccessibilité des EM. Des matériaux de référence et des blancs ont été ajoutés dans chaque série pour les extractions du phosphore assimilable, des bases échangeables, de la capacité d'échange cationique (CEC) et des oxydes.

Paramètre	Norme / protocole	Technique d'analyse et matériel utilisé	Matériau de référence
pH eau	NF EN ISO 10390	pH mètre	-
Carbonates totaux : CaCO₃	NF EN ISO 10693	Calcimètre, méthode volumétrique	-
Phosphore assimilable : P ₂ O ₅	NF X 31-161	Spectrophotomètre UV-visible	Référence interne
Matière organique	NF ISO 10694	Perte au feu	-
Bases échangeables et CEC	NF EN ISO 11260	SAA, AA-6800 Shimadzu	NCS DC85106a
Oxydes Fe, Mn, Al libres	Mehra et Jackson, 1960	SAA, AA-6800 Shimadzu	Référence interne

Tableau 10. Synthèse des protocoles d'analyses des paramètres physico-chimiques des sols

SAA : Spectrométrie d'absorption atomique.

Lors de l'analyse des oxydes de Fe, Mn et Al, des courbes d'étalonnages en Fe, Mn et Al ont été réalisées à partir de solutions mono-élémentaire de concentration 1 g L⁻¹ diluées dans de l'eau bidistillée, qui étaient comprises entre 0,5 et 10 mg L⁻¹ pour le Fe, entre 0,25 et 5 mg L⁻¹pour le Mn et entre 0,5 et 25 mg L⁻¹ pour l'Al. Des points de la gamme étalon ont été analysées tous les 20 échantillons afin d'observer une éventuelle dérive de l'appareil pour corriger les valeurs obtenues. L'analyse du Fe et du Mn a été réalisée par flamme obtenue à partir d'un mélange de gaz air synthétique/acétylène, celle de l'Al à partir d'un mélange protoxyde d'azote/acétylène.

Lors de l'analyse de la CEC et des bases échangeables, des courbes d'étalonnage du K⁺ et du Na⁺ ont été réalisées à partir de solutions mono-élémentaire de concentration 1 g L⁻¹ dans de l'eau bidistillée

qui étaient comprises entre 0,02 mg L⁻¹ et 2 mg L⁻¹. Les courbes d'étalonnages pour le Ca²⁺ et le Mg²⁺ ont été réalisées à partir de solutions mono-élémentaire de concentration 1 g L⁻¹ dans du chlorure de lanthane 10 mg L⁻¹ acidifiée. L'utilisation de cette matrice permet d'éviter les interférences liées à l'analyse de ces deux éléments. Elles s'échelonnent de 0,1 mg L⁻¹ à 20 mg L⁻¹ pour le Ca²⁺ et de 0,025 mg L⁻¹ à 5 mg L⁻¹ pour le Mg²⁺.

Des points de la gamme étalon ont été analysées tous les 20 échantillons afin d'observer une éventuelle dérive de l'appareil pour corriger les valeurs obtenues.

2.2.3. Distribution des EM dans les phases porteuses

La distribution des EM dans les différentes phases porteuses a été mesurée en utilisant la méthode BCR (Bureau Commun de Référence, Rauret, 1999) qui est une procédure d'extraction séquentielle en quatre étapes. A l'issue de cette extraction quatre fractions ont été obtenues et sont présentées dans le Tableau 11.

Etape	Fraction	Cible	Solution d'extraction	Extraction
F1	Echangeable	Carbonates	0,11M d'acide acétique	16h d'agitation à T°C ambiante
F2	Réductible	Oxides	0,5 mol L ^{−1} de chlorure d'hydroxylammonium	
F3	Oxydable	Composés organiques, sulfures	8,8M de H2O2, suivi de 1M d'acétate d'ammonium à pH 2	1h à T°C ambiante, évaporation à 85°C 1h à T°C ambiante, évaporation à 85°C 16h d'agitation à T°C ambiante
F4	Résiduelle	Composés minéraux	Eau régale	Micro-onde fermé (NF ISO 13657)

Tableau 11. Synthèse des étapes de l'extraction séquentielle (méthode BCR, Rauret 1999)

Le BCR CRM 701 a été utilisé comme matériau de référence et un blanc a été ajouté dans chaque série afin de contrôler la qualité de l'extraction. Les extractions ont été réalisées en duplicats pour les sols du Lot 1 et en une seule mesure dans l'expérimentation sur le vieillissement avec ou sans amendements. Les extraits ont été analysés en ICP-OES.

2.2.4. Spéciation chimique du Cr III/VI

La spéciation chimique du Cr a été déterminée dans les sols du lot 1 grâce à la méthode du dosage du Cr VI après digestion alcaline et par chromatographie ionique avec détection spectrophotométrique (NF EN ISO 15192). Le Cr VI est mesuré par spectrophotométrie à 540 nm après dérivation post-colonne par la 1,5-diphénylcarbazide en solution acide. Les contrôles qualités suivants ont été mis en œuvre : (i) un échantillon analysé en double pour vérifier l'exactitude de la méthode ; (ii) un échantillon dopé en Cr III pour vérifier l'absence d'éventuels processus d'oxydation ; (iii) échantillon dopé en Cr VI soluble pour vérifier l'absence d'éventuels processus de réduction. La teneur en Cr III est la différence entre la concentration totale et de Cr VI.

2.3. Mesure de la biodisponibilité orale

2.3.1. Critères de validation in vivo/in vitro

Lors de la validation d'un test *in vitro* au regard d'un modèle *in vivo*, l'objectif est d'obtenir des corrélations entre la BAc relative et la biodisponibilité relative (RBA) qui respectent les critères de validation présentés dans le Chapitre 1 (Billmann et al., 2023). En rappel, généralement il est recommandé d'avoir (US EPA, 2007 ; Wragg et al., 2011 ; Juhasz et al., 2013) :

- une corrélation linéaire statistiquement significative (proche de 1, en pratique R² > 0,6 et r > 0,8);
- une pente proche de 1 (en pratique, entre 0,8 et 1,2) ;
- une ordonnée à l'origine proche de zéro ;
- une gamme suffisamment large de valeurs de biodisponibilité testées (un intervalle d'environ 70% entre les valeurs minimales et maximales), afin de valider la corrélation pour différents types de sol, permettant ainsi théoriquement son utilisation quel que soit le site d'étude ;
- une bonne distribution des valeurs dans la gamme de biodisponibilité ;
- une répétabilité et reproductibilité du test de bioaccessibilité *in vitro*. Les critères sont une répétabilité intra-laboratoire (RSD ou CV) < 10% et une reproductibilité inter-laboratoire (RSD ou CV) < 20%.

Les essais *in vivo* ont été réalisés sur la base de la méthodologie utilisée lors de la validation du test UBM pour l'As, le Cd et le Pb (Caboche, 2009). Ainsi, le choix s'est à nouveau porté vers le modèle porcelet. Les porcelets ont une physiologie digestive proche de celle des humains (Moughan et al., 1992), en particulier de l'enfant (6 mois à 3 ans), ce qui permet d'étudier la RBA des EM en lien avec l'évaluation des risques pour la voie ingestion non intentionnelle de sol pour les enfants car ces derniers sont plus susceptibles d'être exposés du fait de leur comportement main-bouche. En outre, les porcs consomment régulièrement des quantités significatives de sol dans leur environnement naturel, ce qui facilite l'ingestion de sol par voie alimentaire (plus de 400 g par 100 kg_{PC} ; Collas et al., 2023). Des porcelets mâles castrés ont été choisis pour respecter les mêmes protocoles et permettre de comparer cette étude à celle précédemment réalisée.

2.3.2. Calcul de la biodisponibilité relative

La biodisponibilité absolue correspond à la fraction ayant été internalisée (*i.e.* le ratio d'une dose interne sur une dose externe administrée). Sa mesure se confronte à des contraintes éthiques pour les animaux liées à la nécessité d'un suivi cinétique des contaminants dans le sang, et donc de multiples prélèvements ; mais également des contraintes analytiques, notamment lorsque les contaminants sont faiblement biodisponibles, et donc difficilement quantifiables (<LQ) ; d'autant plus que le sang n'est qu'un compartiment transitoire de ces contaminants. C'est pourquoi, dans cette étude, tout comme dans les travaux de Caboche (2009I), la RBA a été calculée en substitution en utilisant les concentrations dans les organes où peuvent se stocker les contaminants (augmentation des concentrations).

La RBA fait référence à la comparaison de la biodisponibilité absolue entre deux matrices différentes et peut être supérieure ou inférieure à 1. Sa détermination est basée sur l'hypothèse que des doses d'exposition identiques d'un contaminant ingéré via deux matrices différentes (matrice de référence et matrice sol), devraient produire une augmentation similaire de la concentration du contaminant dans un compartiment cible donné. Cette approche repose sur l'hypothèse que la concentration d'un composé dans un tissu est proportionnelle à la dose absorbée, et donc la détermination de RBA doit se faire dans le domaine linéaire de la courbe dose-réponse obtenue (Littell et al., 1997). Pour pouvoir assurer la validité de la RBA, il faut donc vérifier :

- que la relation dose-réponse des EM dans les formes de référence soit statistiquement linéaire. La relation dose-réponse représente la relation liant la dose ingérée par jour et par kg de poids vif (poids de l'animal vivant) de chaque EM par rapport aux concentrations d'EM retrouvés dans les différents tissus ;
- la présence de la RBA dans le domaine de linéarité de la relation dose-réponse.

La détermination de la RBA est calculée selon l'Equation 2-1 :

$$RBA (\%) = \frac{Concentration matrice biologique (mg kg^{-1})}{a \times dose (Cr ou Ni mg kg^{-1}) \times intercept}$$
Equation 2-1

Avec RBA, la biodisponibilité relative ; Concentration matrice biologique : la concentration de Cr ou Ni mesurée dans les organes cibles (mg kg⁻¹) ; a : la pente de la relation dose-réponse de la forme de

référence étudiée ; intercept : la valeur de l'ordonné à l'origine (concentration dans les organes des porcelets non exposés).

2.3.3. Les formes de référence

Dans le but de comparer les biodisponibilités absolues des EM dans les sols à celle des formes de référence, ces dernières doivent être sous une forme favorable à leur solubilisation durant les processus digestifs. Concernant le choix des formes de référence pour le Cr et le Ni, d'après les données de la littérature, différents essais ont été réalisés *in vivo* à partir desquels les valeurs toxicologiques de référence (VTR) ont été dérivées pour le Cr et le Ni. Ces expérimentations *in vivo* ont été réalisées en utilisant comme référence des formes de Cr III, Cr VI et Ni II. Les formes de référence choisies sont présentées dans le Tableau 12.

Elément	Forme de référence	CAS	Etude <i>in vivo</i>	
Cr VI	Dichromate de sodium dihydraté :	7789-12-0	NTP (2008)	
	$Cr_2H_4Na_2O_9$	//05 12 0	1111 (2000)	
Cr III forme	Hydroxyde d'acétate de chrome (III) :	39/130-51-8	RIVM (2001)	
soluble	C ₁₄ H ₂₃ Cr ₃ O ₁₆	55450-51-0	111111 (2001)	
Cr III forme	Picolinate de chrome (III) : CraHaCrNaOa	14639-25-9	NTP (2010)	
insoluble		14035 25 5	NIF (2010)	
Ni	Sulfate de Nickel (II) hexahydraté :	10101-97-0	SII (2000)	
INI	$NiSO_4 \cdot 6H_2O$	10101-57-0	511 (2000)	

Tableau 12. Formes de référence du Cr et du Ni utilisées dans ces travaux

2.3.4. Démarche expérimentale

2.3.4.1. Evaluation de la relation dose-réponse

Pour l'évaluation de la relation dose-réponse, trois bandes composées de 24 porcelets chacune ont été exposées pendant 15 jours via une forme de référence incorporée dans une matrice alimentaire. Pour chaque forme de référence, 7 doses ont été considérées avec 3 replicats par dose (Tableau 13).

Dose mg kg⁻ ¹ de PV j⁻¹	Sulfate de nickel (II) hexahydraté	Dichromate de sodium dihydraté (Cr VI)	Hydroxyde d'acétate de chrome (Cr III)	Picolinate de chrome (Cr III)
DO	0	0	0	0
D1	0,044	0,020	0,104	0,104
D2	0,076	0,030	0,183	0,183
D3	0,133	0,060	0,320	0,320
D4	0,233	0,100	0,560	0,560
D5	0,408	0,180	0,980	0,980
D6	0,714	0,310	1,714	1,714
D7	1,250	0,550	3,000	*

Tableau 13. Formes de référence et doses d'exposition (exprimées en mg de contaminant par poids vif et par jour)

*dose non testée à la suite des premiers résultats sur les autres formes de référence montrant la fin de la linéarité de la courbe dose/réponse pour la dernière dose D7. Cela a permis de réduire le nombre de porcelets mis à mort en suivant une méthode réglementaire éthique.

Les doses choisies sont inférieures aux doses susceptibles d'engendrer des effets adverses aux porcelets. Elles sont inférieures aux NOAEL (No Observable Adverse Effect Level : la dose maximale sans effet néfaste observable) pour les effets à seuil et les plus limitées possibles pour les effets sans seuil liés au Cr VI. A savoir que la survenue de tumeur décrite dans la littérature est peu probable sur notre durée d'exposition de 14 jours (NTP, 2008).

Le protocole a été approuvé par le Comité Ethique (APAFIS #41135-2023022116357533 v3).

2.3.4.2. Exposition des porcelets aux sols sélectionnés

Les porcelets ont été exposés à une dose unique calculée pour chacun des 9 sols testés pour atteindre des niveaux quantifiables dans les tissus/organes. Les doses d'exposition en Cr et Ni ont été adaptées pour présenter le minimum possible de toxicité pour les animaux. Comme pour les formes de référence, elles étaient inférieures aux NOAEL pour les effets à seuil et les plus limitées possibles pour les effets à sans seuil liés au Cr VI. Les quantités de sol ingérées ne devaient pas dépasser les 10 g de sol par jour afin de rester dans le même ordre de grandeur de l'exposition de l'enfant (US EPA, 2017) et de s'assurer que les porcelets ingèrent bien la totalité de l'échantillon de sol. Cette quantité, adaptée au poids vif de l'animal, a été introduite dans des boulettes de granulés humidifiés pour exposer quotidiennement les porcelets.

Les porcelets ont été soumis à une période d'acclimatation (7 à 10 jours) avec une alternance de compartiments individuels/collectifs afin de les adapter au mieux à la phase expérimentale (Figure 2-4). Les porcelets ont été exposés durant une période de 2 semaines. Les aliments contaminés ont été distribués le matin aux porcelets qui ont été séparés au moyen d'un séparateur dans une cage

(pendant moins de 4 heures) afin de mieux contrôler leur exposition. À la suite de l'ingestion, les compartiments amovibles ont été retirés pour laisser les animaux en groupes de trois pour chaque dose d'exposition. Les animaux ont été pesés trois fois par semaine (lundi, mercredi et vendredi) afin d'adapter la dose d'exposition et de vérifier leur bien-être. A la fin de l'expérimentation, les animaux ont été mis à mort éthiquement en suivant une méthode réglementaire (saignée après électronarcose) pour le prélèvement des tissus sélectionnés (foie, rate, rein, os).

2.3.4.3. Analyses des matrices biologiques

Les concentrations en EM ont été déterminées dans les foies, les reins, les rates et les os selon la méthode appliquée lors de l'étude précédente sur la validation du test UBM de Caboche (2009) (Figure 5). 1 g de matrice biologique séchée de foie, de rein ou de rate a été minéralisé par digestion au four à micro-ondes en milieu fermé dans un tube en téflon avec l'ajout de 6 mL d'HNO₃ (70%). Les métacarpes ont été séchés pendant toute une nuit avant d'avoir été calcinés à 550°C durant 12 heures dans un four à moufles puis les cendres obtenues ont été finement broyées et homogénéisées. Finalement, 0,5 g de cendre a été minéralisé de la même manière que précédemment. Après la minéralisation, le volume des solutions de minéralisation (foie, rein et métacarpe) a été ajusté à 30 mL avec de l'eau Milli-Q. Les solutions de minéralisation ont ensuite été analysées par ICP-MS.

Afin de s'assurer de la qualité des phases de préparation, de minéralisation et dosage des échantillons, un blanc et un matériau de référence (Foie de bovin 1577c) ont été ajoutés dans chaque série de minéralisation dans le but de vérifier le bon déroulement de l'extraction ainsi que l'absence de contamination et l'exactitude des résultats d'analyses. Pour chaque série d'analyses, un étalon de contrôle (50% du point haut de la gamme d'étalonnage) et un blanc de réactifs ont été placés tous les 10 échantillons afin de vérifier le bon déroulement de l'analyse, la non-contamination entre les échantillons et la possible dérive de la réponse analytique de l'appareil dans le temps.



Figure 5. Démarche des essais in vivo, mode de préparation des matrices biologiques et implication des doctorantes (adapté de Caboche, 2009)

2.4. Mesure de la bioaccessibilité orale des EM dans les sols

2.4.1. Test UBM

Le test UBM (Unified Bioaccessibility Method ; NF ISO 17924:2019) est considéré comme la méthode de référence en France. Il permet d'estimer la fraction bioaccessible des EM et est à ce jour validé in vivo/in vitro pour l'As, le Cd et le Pb (Denys et al., 2012). Le protocole, présenté dans la Figure 6, a été appliqué sur l'ensemble des échantillons collectés des Lots 1 et 2 et a permis d'évaluer la bioaccessibilité de Cr et Ni ainsi que des autres EM. Les fluides utilisés dans le cadre de ce protocole sont constitués de réactifs organiques et inorganiques de composition proche de celle du fluide digestif humain et sont préparés un jour avant la réalisation des extractions. Cette mesure est réalisée à partir d'une masse de 0,6 g de sol, tamisé à 250 µm, à laquelle sont ajoutés 9 mL de solution salivaire puis 13,5 mL de jus gastrique. Le pH de la suspension est ensuite ajusté à 1,20 ± 0,05 par l'ajout d'HCl (37%). Après agitation pendant 1 h à 37°C, la phase gastrique est collectée par centrifugation de la suspension à 4 500 G pendant 5 minutes. Le surnageant est prélevé et acidifié par 50 μL de HNO₃ (70%) et les concentrations en EM mesurées représentent leurs fractions bioaccessibles dans la phase gastrique (G). La fraction intestinale est mesurée en ajoutant 27 mL de jus duodénal et 9 mL de bile. Le pH de la suspension est ajusté à 6,3 ± 0,5 par ajouts d'HCl (37%) ou de NaOH (10 M). La suspension est ensuite homogénéisée pendant 4 h à 37°C, centrifugée à 4 500 G pendant 5 minutes. Le surnageant obtenu est acidifié par 100 μ L de HNO₃ (70%) et analysé en vue de déterminer les concentrations en éléments métalliques dans la phase gastro-intestinale (GI). Pour chaque échantillon, des triplicats sont réalisés, et ceci dans les deux phases d'extraction, et les résultats obtenus correspondent à la moyenne des triplicats pour chaque échantillon.



Figure 6. Schéma du protocole du test UBM (NF ISO 17924:2019)

Les concentrations bioaccessibles dans les deux phases ont été déterminées par ICP-OES. Lorsque les concentrations étaient inférieures aux limites de quantifications atteignables par cette technique analytique, les extraits ont été analysés par spectroscopie de masse couplée à un plasma induit (ICP-MS), après avoir été dilués d'un facteur 10 dans une solution d'acide nitrique à 1%. La méthode analytique est la même que celle employée lors des analyses en ICP-OES, à la différence des courbes d'étalonnage avec des concentrations en EM échelonnées de 0 à 100 µL L⁻¹ cette fois. Pour contrôler la qualité des résultats de bioaccessibilité, un blanc et un matériau de référence CNRC PACS-3 pour le lot 1 et NIST 2710a pour le lot 2 ont été ajoutés par série dans chaque phase (G et GI).

Les concentrations bioaccessibles sont exprimées en mg kg⁻¹ de poids sec. La bioaccessibilité est ensuite exprimée en pourcentage par rapport aux concentrations totales et correspond ainsi à la BAc absolue (Equation 2-2). Elle peut également être exprimée de manière relative en la comparant à la bioaccessibilité absolue d'une forme de référence (Equation 2-3). Ainsi, le test UBM a également été réalisé sur les formes de référence (Tableau 13.) qui ont été sélectionnées dans le cadre de l'expérimentation *in vivo* en 5 réplicats.

BAc absolue (%) =
$$\frac{Concentration \ bioaccessible \ (mg \ kg^{-1})}{Concentration \ pseudototale \ sol \ (mg \ kg^{-1})} \times 100$$
 Equation 2-2.

$$BAc \ relative \ (\%) = \frac{BAc \ absolue \ sol \ (\%)}{BAc \ absolue \ forme \ de \ référence \ (\%)}$$
Equation 2-3

2.4.2. Test simplifié à l'HCl pour la prédiction de la bioaccessibilité

Un second protocole a été considéré pour approcher la bioaccessibilité des EM. Un test simplifié, en cours de normalisation (ISO DIS 7303), a été développé par Pelfrêne et al., (2020) afin de prédire en première approche la bioaccessibilité orale de Cd, Pb et As dans les sols grâce à des équations présentées dans le Tableau 14. Cette méthode a été utilisée et appliquée sur l'ensemble des échantillons collectés pour les lots 1 et 2 en vue notamment de le tester sur d'autres EM comme Cr, Ni et Sb. Cette méthode, présentée dans la Figure 7, repose sur une extraction à l'HCl dilué (0,65% v/v). Une masse de 30 mg de sol (tamisé à 250 μ m) est pesée en triplicats et placée dans des tubes de polypropylène de 50 mL avant d'ajouter 25 mL de la solution d'HCl. Les tubes sont ensuite placés dans un bain à ultrasons (Elmasonic S120, Grosseron, France) pendant 15 min. Pour mimer la digestion, les tubes sont placés dans une enceinte thermostatée pendant 1 h à 37°C avant d'être filtrés (filtres en acétate de cellulose de porosité 0,45 μ m). Les concentrations extraites ont été

déterminées par ICP (-OES ou -MS) et sont exprimées en mg kg⁻¹ de poids sec et en pourcentage par rapport aux concentrations totales mesurées dans l'échantillon de sol. Pour contrôler la qualité des résultats de bioaccessibilité, un blanc et un matériau de référence CNRC PACS-3 pour le lot 1 et NIST 2710a pour le lot 2 ont été ajoutés par série. La méthode analytique est la même que pour les autres dosages.

Tableau 14. Equations de prédiction de la bioaccessibilité UBM à partir des concentrations extraites à l'HCl (Pelfrêne et al., 2020)

Element	Phase gastrique	Phase gastro-intestinale
As	log ₁₀ [As] _{UBM} = 0,83 x log ₁₀ [As] _{HCl} + 0,16	log ₁₀ [As] _{UBM} = 0,80 x log ₁₀ [As] _{HCl} + 0,13
Cd	log ₁₀ [Cd] _{UBM} = 1,00 x log ₁₀ [Cd] _{HCl} - 0,01	log ₁₀ [Cd] _{UBM} = 1,03 x log ₁₀ [Cd] _{HCl} - 0,41
Pb	$log_{10}[Pb]_{UBM} = 1,01 \times log_{10}[Pb]_{HCI} - 0,06$	$log_{10}[Pb]_{UBM} = 1,11 \times log_{10}[Cd]_{HCI} - 1,28$



Figure 7. Schéma du protocole du test simplifié HCl pour la prédiction de la bioaccessibilité

2.5. Mise en place d'une expérimentation de vieillissement accéléré des sols avec ou sans apport d'amendements (compost, biochar)

Cinq échantillons de sol du lot 1 ont été sélectionnés pour tester l'influence de la temporalité avec ou sans apport d'amendements (compost, biochar) sur la bioaccessibilité du Cr et du Ni en particulier mais aussi sur les autres EM. Les sols ont été renommés de S1 à S5 (Tableau 8). La sélection a été réalisée de manière à avoir au moins deux sols présentant des concentrations en Cr et en Ni bioaccessibles élevées et deux sols contaminés présentant du Cr VI. Les sols proviennent de divers sites contaminés de France. S1, S2 et S3 proviennent respectivement d'un terril, d'un ancien site métallurgique et d'une zone industrielle, S4 provient d'un site adjacent à une usine de chromage et S5 provient d'une friche urbaine (Tableau 8). Dans le but d'étudier l'influence de la temporalité sur la bioaccessibilité des EM, un protocole de simulation de vieillissement a été mis en place en se basant

sur la littérature (Dagois et al., 2015 ; Nguyen, 2019). Le design expérimental pour cette étude est présenté dans la Figure 8.



Figure 8. Expérimentation de vieillissement accéléré, avec ou sans apport d'amendements (compost, biochar (adapté de Nguyen, 2019) ; T : témoin ; C : compost ; B : biochar

Pour cette expérimentation, 50 g de sol ont été pesés par pot pour chacun des cinq sols. Toutes les modalités ont été réalisées en triplicats. Pour les modalités amendées, 2,5 g de biochar ou de compost ont été ajoutés avant d'être mélangé afin d'homogénéiser la préparation. Les sols témoins ainsi que les sols amendés ont été ajustés à la capacité au champ par ajout d'un mélange d'eau osmosée et d'eau du robinet dans le but de limiter l'acidité de l'eau osmosée (4/5 eau osmosée et 1/5 eau du robinet). Les différentes modalités ont ensuite été laissées 3 jours afin que les échanges entre les amendements et les composés des sols puissent se faire. Cette expérimentation a duré 3 semaines au total et chaque semaine simule une année de vieillissement. Ce protocole a comme intention d'être représentatif du climat en France tout en proposant des conditions drastiques de températures, en accord avec les changements climatiques. Chaque cycle (semaine) est composé de (i) 3 phases de gel (6 h) /dégel (18 h) pour simuler l'hiver ; (ii) 2 phases à température élevée (38°C, 6 h) pour simuler l'été ; (iii) puis les 2 jours et demi restant à 28°C qui correspond à l'optimum de développement microbiologique (Figure 2-5). La teneur en eau est ajustée à la capacité au champ chaque jour et l'ajout est fait par le bas afin de ne pas tasser les sols ni modifier leur oxygénation. Le pH, la distribution dans les phases porteuses (extraction séquentielle méthode BCR ; Rauret 1999) ainsi que la bioaccessibilité (test UBM), ont été déterminés à T0 et à T3 pour étudier l'influence du vieillissement accéléré avec et sans amendements sur ces paramètres. Des analyses minéralogiques à T0 et T3, dans les sols initiaux et dans les culots provenant des extractions des phases G et GI du test UBM ont également été réalisées par diffractométrie des rayons X (DRX).

L'analyse de la minéralogie par DRX de la fraction broyée à <2 µm a été réalisée par diffractomètre XD8 Advance BRUKER AXS (Siemens) par le laboratoire E2Lim de l'Université de Limoges ainsi que par le laboratoire Géosciences d'UniLaSalle. Les phases minérales sont quantifiables lorsqu'elles sont supérieures à 5%, les résultats ont été présentés en données semi quantitatives dans l'étude.

2.6. Traitement statistique

Le traitement des données et les analyses statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Excel et de son extension XLSTAT 2022.1.1 (Addinsoft). Les différents tests statistiques mis en œuvre dans ces travaux sont présentés dans le Tableau 15.

Test statistique	Paramètres étudiés
Test de Spearman	 Etude de l'influence sur la bioaccessibilité : Des paramètres physico-chimiques du sol De la distribution dans les phases porteuses De la spéciation du Cr VI
Test U de Mann- Whitney (bilateral)	 Etude de la différence entre les sols anthropiques et les sols naturellement enrichis pour : La bioaccessibilité du Cr et du Ni Les paramètres physico-chimiques des sols La distribution des EM dans les phases porteuses des sols
T test par paire	Mesure de la différence de pH et de la bioaccessibilité entre les échantillons avant et après vieillissement accéléré
ANOVA	Analyses des différences de concentration totale selon le mode de préparation des échantillons

Tableau 15.	Tests statistiques	s utilisés dans	les	différentes	études
Tubicuu 15.	i colo otatiotique.	s atmses aams	100	uniciciiico	cluucs

Significativité des tests statistiques : p < 0,05

Chapitre 3 : Etude de la bioaccessibilité de deux nouveaux éléments métalliques : le Cr et le Ni dans des sols multi-contaminés

La bioaccessibilité du Pb, de l'As et dans une moindre mesure du Cd est largement étudiée dans la littérature et la plupart des tests *in vitro* de BAc sont validés IVIV pour ces EM. Ainsi, ce chapitre est une étude de la bioaccessibilité de deux nouveaux EM à savoir, le Cr et le Ni car leur présence peut également être préoccupante dans les études SSP. Pour cela, ce chapitre se divise en trois sous parties présentées dans la Figure 9. La première partie est une étude du Cr et du Ni tout en considérant les autres EM (As, Cd, Pb et Sb) dans des sols multi-contaminés dont l'objectif est d'étudier leur bioaccessibilité et de montrer l'intérêt de la prendre en compte dans les ERS (Chapitre 3.1). Dans la seconde partie, il s'agit d'étudier l'influence du temps (vieillissement accéléré) avec ou sans apport d'amendements (compost, bioachar) sur la bioaccessibilité du Cr et du Ni et des autres EM (As, Cd, Pb et Sb) (Chapitre 3.2). Enfin la dernière partie vise à valider IVIV le test UBM pour Cr et Ni en comparant les données de bioaccessibilité à leur biodisponibilité mesurée dans un modèle animal (porcelets).



Figure 9. Schéma des méthodes mises en œuvre dans le Chapitre 3

Partie 1 : Intérêt de mesurer la bioaccessibilité du chrome et du nickel dans les sols multi-contaminés lors de l'évaluation des expositions et des risques sanitaires

Cette partie vise à mesurer la bioaccessibilité de Cr et Ni dans les sols pour l'évaluation des expositions et des risques. Une attention sera portée à l'étude du Cr VI, forme sous laquelle le Cr est plus toxique particulièrement pour les effets sans seuil pour la voie orale, et aussi particulièrement préoccupant pour les risques sanitaires qu'il peut générer. Du fait de la multi-contamination de ces sols, la BAc des autres EM, à savoir, l'As, le Cd, le Pb et le Sb a également été étudiée dans cette partie.

3.1. Etude de la bioaccessibilité du Cr et du Ni et des autres EM

L'étude de la bioaccessibilité du Cr et du Ni dans les sols lors de l'évaluation des expositions et des risques a fait l'objet d'un article scientifique intitulé « Toward a more realistic estimate of exposure to chromium and nickel in soils of geogenic and/or anthropogenic origin: Importance of oral bioaccessibility » et publié dans Environmental Geochemistry and Health (doi.org/10.1007/s10653-024-02041-z). Cet article s'est intéressé à la BAc du Cr et du Ni de 27 sols multi-contaminés (Tableau 8) provenant de différentes origines géographiques (France métropolitaine et départements français d'outre-mer, Belgique, Grèce et Irlande du Nord), dans lesquels les sources de contaminations pouvaient être anthropiques et/ou géogènes, de contextes variés (industriel, minier, urbain, ...) et présentant une large gamme de concentrations et une variabilité des paramètres physico-chimiques du sol. L'objectif est de montrer la plus-value que pourrait représenter la mesure de la BAc orale du Cr et du Ni pour évaluer de manière plus réaliste les expositions et les risques de la population. Plus précisément, la BAc du Cr et du Ni a été estimée en utilisant à la fois le test UBM et le test simplifié HCl prédictif de BAc afin de pouvoir comparer ces données à la BAc observée dans la littérature, et d'avoir une première idée concernant le potentiel du test simplifié pour prédire la BAc du Cr et du Ni.

ORIGINAL PAPER



Toward a more realistic estimate of exposure to chromium and nickel in soils of geogenic and/or anthropogenic origin: importance of oral bioaccessibility

Madeleine Billmann · Aurélie Pelfrêne · Corinne Hulot · Arnaud Papin · Benjamin Pauget

Abstract

To enhance risk assessment for contaminated sites, incorporating bioavailability through bioaccessibility as a corrective factor to total concentration is essential to provide a more realistic estimate of exposure. While the main in vitro tests have been validated for As, Cd, and/or Pb, their potential for assessing the bioaccessibility of additional elements remains underexplored. In this study, the physicochemical parameters, pseudototal Cr and Ni concentrations, soil phase distribution, and oral bioaccessibility of twenty-seven soil samples were analysed using both the ISO 17924 standard and a simplified test based on hydrochloric acid. The results showed wide variability in terms of the concentrations (from 31 to 21,079 mg kg⁻¹ for Cr, and from 26 to 11,663 mg kg⁻¹ for Ni) and generally low bioaccessibility for Cr and Ni, with levels below 20% and 30%, respectively. Bioaccessibility variability was greater for anthropogenic soils, while geogenic enriched soils exhibited low bioaccessibility. The soil parameters had an influence on bioaccessibility, but the effects depended on the soils of interest. Sequential extractions provided the most comprehensive explanation for bioaccessibility. Cr and Ni were mostly associated with the residual fraction, indicating limited bioaccessibility. Ni was distributed in all phases, whereas Cr was absent from the most mobile phase, which may explain the lower bioaccessibility of Cr compared to that of Ni. The study showed promising results for the use of the simplified test to predict Cr and Ni bioaccessibility, and its importance for more accurate human exposure evaluation and effective soil management practices.

Keywords

Contaminated soil; potentially toxic elements; *In vitro* testing; Chemical extraction; Origin of contamination

3.1.1. Introduction

Anthropogenic sources are releasing an increasing amount of potentially toxic elements (PTEs) into the environment as a result of increasing industrialization and urbanization (Lwin et al., 2022). Because of these multiple sources in soils, such as industrial activities, mining, and the use of pesticides and fertilizers, PTEs have become a growing public health concern worldwide (Ayangedenro & Babalola, 2017; Kumar et al., 2022). However, there are also many areas with a high geochemical background which people live without known adverse effects, probably due to the low mobility and bioavailability of PTEs (Barsby et al., 2012; Fernandez-Caliani et al., 2020; Juhasz et al., 2007). Chromium (Cr) and nickel (Ni) are two PTEs that are widely distributed in soils. These PTEs are needed in small amounts for biological functions but can have adverse effects on human health, such as damage to the respiratory, digestive, and nervous systems if the exposure dose is too high (ATSDR, 2012a, b). The ingestion of soil particles is one of the main contamination pathways, especially for children who are more likely to engage in hand-to-mouth behaviour (Dudka and Miller 1999). There is now a consensus that using total (or pseudototal) concentrations can lead to an overestimation of exposure (Badaahmadifooladi et al., 2020; Mehta et al., 2019; Wang et al., 2023; ...) and can lead to high management costs and overly stringent restrictions for local residents (Zhong and Jiang 2017). Indeed, only the bioavailable fraction can lead to adverse effects. It corresponds to the fraction of the contaminant that reaches systemic circulation after dissolution from the soil matrix in gastric juice and absorption by the intestinal epithelium (Semple et al., 2004). However, the measurement of oral bioavailability requires in vivo experiments (e.g., piglets, mice, and monkeys), which are lengthy, expensive, and ethically questionable. Bioaccessibility (BAc) corresponds to the fraction of contaminants in soil that are dissolved by digestive fluids and represents the maximum amount that can reach systemic circulation and produce toxic effects (Paustenbach 2000). Numerous in vitro tests have been developed to simulate this dissolution step (e.g., PBET, Ruby et al., 1996; SBRC, Kelley et al., 2002; Method 1340, US EPA, 2017; SBET, Medlin, 1997; IVG, Rodriguez and Basta, 1999; DIN, Hack et al., 2002; UBM; Denys et al., 2012; ISO 17924, 2019; RIVM, Oomen et al., 2003).

Many studies have shown the importance of taking bioavailability into account by measuring BAc rather than pseudototal concentrations to avoid risk overestimation. As and Pb, and to a lesser extent Cd, are the most widely studied PTEs in the literature and most *in vitro* tests have been validated relative to *in vivo* models for them (Li et al., 2019). However, other PTEs, such as Cr and Ni, are also of interest since studies in the literature have shown that the BAc of Cr and Ni was mostly less than 20% for Cr and less than 30% for Ni (Billmann et al., 2023; Bourliva et al., 2021; Ding et al., 2014; Gu et al., 2016; ...). Moreover, the presence of Cr and Ni in soils is often associated with health risks due to their occurrence in numerous legacy sites.

Among *in vitro* tests showing the maximal *in vitro in vivo* criteria, the unified bioaccessibility method (UBM) has been validated for As, Cd, and Pb (Denys et al., 2012; Li et al., 2019) and is also standardized (ISO 17924, 2019). The UBM test is therefore considered a reference method to for assessing the oral BAc in many countries, especially in Europe. Previous work (Pelfrêne et al., 2020) was conducted to develop a simplified test based on extracting PTEs with an HCl solution for predicting the BAc of As, Cd and Pb. This test is simpler, faster and can be used in screening to obtain a first approximation of BAc.

This paper presents an investigation of the BAc of Cr and Ni in 27 soil samples from different geographical origins (metropolitan France and French overseas departments, Belgium, Greece, and Northern Ireland), PTE sources (anthropogenic and₇ geogenic), and contexts (e.g., industrial, mining, and urban) over a wide range of concentrations and soil physicochemical parameters. The aim of this work was to highlight the importance of measuring the oral BAc of Cr and Ni to assess more realistic population exposure and health risks. More specifically, the BAc of Cd and Ni was estimated using both the UBM and simplified HCl tests. Specific attention was given to the contamination origin, physicochemical soil parameters, PTE phase distribution and geochemistry, which were assessed to understand how BAc is affected by these parameters.

3.1.2. Materials and methods

3.1.2.1. Soil sample collection and characterization of soil parameters

A total of 27 soil samples were collected in the same way at 13 different contaminated sites located in metropolitan France, its overseas departments and Europe. These sites have different uses, origins, and sources of contamination (Table 16). These samples also included a wide range of physicochemical parameters and concentrations of Cr and Ni. For each site, a composite topsoil sample was constituted and sent to the laboratory where all soil samples were prepared using soft techniques (oven drying at 40 °C and then sieving to 2 mm). A portion was then sieved to 250 µm using a sieve shaker (AS200 Control, Retsch).

The pseudototal concentrations of PTEs were obtained by acid digestion with aqua regia (6 mL HCl and 2 mL HNO₃) added to 0.4 g of soil, dried and sieved to 250 μ m in a closed microwave oven (NF 13657) and determined by inductively coupled plasma with optical emission spectrometry (ICP OES, Agilent). The limits of quantification averaged 5 μ g L⁻¹ for Cr and 10 μ g L⁻¹ for Ni. Unlike hydrofluoric acid mineralization (determination of total concentration), *aqua regia* does not dissolve silicates; therefore, only the pseudototal concentration can be determined. Triplicates were made for each soil sample. The soil pH was measured in a mixture (1:5, v/v) of 2 mm sieved matrix and water (NF ISO 10390). The total carbonate content (CaCO₃) of the <250 μ m soil fraction was determined via the

volumetric method (NF ISO 10693). The method consists of quantifying the release of CO₂ produced by the reaction between carbonates present in the soil sample and hydrochloric acid. Assimilable phosphorus, expressed as P₂O₅, was cold extracted from the 2 mm sieved matrix according to NF X31161. Organic matter (OM) was determined in the <250 μ m soil fraction with the NF ISO 10694 standard (i.e., determination of organic carbon by dry combustion). The exchangeable bases (EBs) Na⁺, K⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ were determined in the <250 μ m soil fraction by saturation of the binding sites with a barium chloride solution of 0.1 mol L⁻¹. The cation exchange capacity (CEC) was determined after the extraction of EBs by saturation with a known amount of magnesium sulfate (0.02 mol L⁻¹) and by measuring the excess Mg. Single extraction with a mixture of solutions (0.111 mol L⁻¹ sodium bicarbonate, 0.267 mol L⁻¹ sodium tricitrate, and 200 g L⁻¹ sodium dithionite) was performed on the 250 μ m soil fraction to extract free Fe, Mn, and Al oxides (i.e. oxides not bonded to silicates) (Mehra and Jackson, 1960). The EBs, Mg and oxide concentrations were measured using an atomic absorption spectrometer (AAS, AA-6800 Shimadzu). Blanks and certified materials were run in each series to control the quality of the analysis. For the pseudototal concentrations, the SRM NIST2710a was used as a certified material and the recovery averaged 91% for Cr and 132% for Ni.

3.1.2.2. Chemical extraction methods

Sequential chemical extraction

Cr and Ni fractionation was estimated using a three-step sequential extraction procedure recommended by the Standard Measurement and Testing Program (SM&T) of the European Community, formerly BCR (Rauret et al., 2000). The fractions F1, F2, F3, and F4 were defined as (a) exchangeable, water- and acid-soluble (0.11 mol L⁻¹ acetic acid), (b) reducible (0.5 mol L⁻¹ hydroxylammonium chloride), (c) oxidizable (8.8 mol L^{-1} H₂O₂, followed by 1.0 mol L^{-1} ammonium acetate at pH 2), and (d) residual (aqua regia), respectively. Each suspension was mixed in a mechanical horizontal shaker for 16 hours. Sequential extraction methods were used to assess PTE association and distribution with the different solid phase components in soils and to provide knowledge on PTE affinity to the soil components and the strength with which they are bound. Soil samples were digested in successive extraction solutions to mobilize element fractions with decreasing mobility and availability. The first step was targeting the PTEs contained in the soil solution, carbonates and exchangeable PTEs. These PTEs are considered readily mobile and bioavailable (F1). The second and third steps involved targeting the PTEs occluded in Fe, Mn and Al oxides and hydroxides (F2), or complexed with OM and sulfides (F3). The PTEs bound to these compounds are generally less available, depending on the soil matrix and the strength of the interaction between the PTE and the compounds. The final step consisted of targeting the PTEs contained in the residual fraction (F4), which is the least readily available fraction because it corresponds to the remaining share of PTEs bound to nonsilicate compounds (Žemberyová et al., 2006). BCR CRM 701 was used as standard reference material. The sum of recoveries of the reference material extraction steps was between 76 and 103% of the pseudototal concentrations for Cr and Ni.

In vitro oral BAc measurements of Cr and Ni

The BAc of Cr and Ni in the soil samples (dried and sieved to < 250 mm particle size) was assessed first using the UBM, which is a validated and standardized in vitro extraction method (Unified Bioaccessibility Method; ISO 17924; Denys et al., 2012). The test consisted of two parallel sequential extractions and provided samples for analysis from both the gastric (G) and gastrointestinal (GI) phases. The fluids used in this protocol consisted of organic and inorganic reagents with a composition close to that of human digestive fluid (Pelfrêne et al., 2020) and were prepared one day before the extractions were performed. Triplicates were made for each sample in both the gastric and gastrointestinal phases. This measurement was performed on a mass of 0.6 g of soil to which 9 ml of saliva fluid was added, followed by 13.5 ml of gastric fluid. The pH of the suspension was then adjusted to 1.20 ± 0.05 by adding HCl (37%). After end-over-end shaking at 37 °C for 1 hour, the G phase was obtained by centrifuging the suspension at 4,500 ×g for 5 minutes. The intestinal fraction was measured by adding a liquid simulating intestinal digestive fluid, i.e., 27 ml of duodenal solution and 9 ml of bile solution. The pH of the suspension was adjusted to 6.3 ± 0.5 by adding NaOH (10 M). The suspension was then homogenized at 37 °C for 4 hours and centrifuged as before. The resulting supernatants were acidified and analysed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS) to determine the bioaccessible PTE concentrations in both phases. Quality control was based on the use of blanks and the NRC-CNRC PACS-3 reference material. The BAc of the PTEs was expressed in mg kg^{-1} and as a percentage of the pseudototal concentration. The limits of quantification were 0.19 μg L^{-1} for Cr and 0.13 µg L^{-1} for Ni on average.

In the second approach, a simplified test based on simple extraction with diluted HCl (Pelfrêne et al., 2020), developed to predict the oral BAc of As, Cd, and Pb in both the G and GI phases, was carried out on 27 soil samples to measure the extractable concentrations of Cr and Ni. For HCl extraction, 0.03g of soil was weighed in triplicate and placed in polypropylene tubes before adding 25 mL of the HCl solution (0.65% v/v). The tubes were then placed in an ultrasonic bath (Elmasonic S120, Grosseron, France) for 15 min at room temperature. To mimic digestion, the tubes were placed in a thermostatic chamber for 1 h at 37 °C before being filtered (0.45 μ m of porosity). The extractable concentrations of Cr and Ni were measured by ICP MS. The data were log-transformed to improve the distribution and linearity of the linear regression between the concentrations extracted by the UBM

90
test and the HCl test. Quality control was based on the use of blanks and the PACS-3 reference material. The extractable fractions of PTEs determined by the HCl test are expressed in mg kg⁻¹ and in% of pseudototal concentrations. The limit of quantification was 0.4 μ g L⁻¹ for both elements on average.

3.1.2.3. Chemical speciation of Cr

Chromium speciation was determined by Cr(VI) determination via alkaline digestion and ion chromatography with spectrophotometric detection (NF ISO 15192). Cr(VI) was measured spectrophotometrically at 540 nm after postcolumn derivatization with 1,5-diphenylcarbazide (DPC) in acidic solution. To verify the accuracy of the method, the following quality controls were performed: (i) analysis of a sample in duplicate to check the accuracy of the method; (ii) doping of the sample with Cr(III) to check the absence of possible oxidation processes; and (iii) doping of the sample with soluble Cr(VI) to check the absence of possible reduction processes. The Cr(III) content is the difference between the pseudototal and Cr(VI) concentrations.

3.1.2.4. Statistical analysis

Statistical analysis of the data was performed using XLSTAT 2022.1.1 (Addinsoft). Spearman correlation was performed to study the influence of soil parameters on bioaccessibility and significant correlations at the 0.05 level are highlighted. Spearman's nonparametric statistical test is used to test the effect of one quantitative variable on another and to detect a trend of any form. This test determines whether the two variables are related. The Wilcoxon–Mann–Whitney Rank Sum two-sided test (U test) was performed to study the difference between anthropogenic (n=19) and naturally enriched (n=8) soils according to Cr and Ni BAc (G and GI phases), and soil physicochemical parameters and their soil phase distributions and significant differences between the variable means at the 0.05 level are highlighted and presented in SM1.

3.1.3. Results and discussion

3.1.3.1. Physicochemical properties of the soil

The pseudototal concentrations of Cr and Ni and the physicochemical parameters of the 27 soil samples are presented in Table 1. The pseudototal concentrations varied from 26 to 11,663 mg kg⁻¹ for Ni and from 31 to 21,079 for Cr. The speciation of Cr was assessed, and the Cr (VI) concentrations varied from <0.1 (LQ) to 1,012 mg kg⁻¹, which corresponds to a range from 0.02 to 13.5% of the

pseudototal concentrations=; this indicates that Cr was mostly found in the +3 oxidation state which corresponds to its cationic form. The physicochemical parameters showed relatively high variability, highlighting the wide heterogeneity of the soils. The soil pH varied from acidic (5.1) to basic (9.3). These soils also contained wide ranges of total carbonate=, organic matter (OM) and assimilable phosphorus (P_2O_5) contents, from <0.1 to 516 g kg⁻¹, 1 to 27%, and <6 to 2,383 mg kg⁻¹ respectively. The CEC was between 2 and 104 cmol+ kg⁻¹, which indicates the number of cation sites (e.g. CrIII and Ni²⁺) retained. The exchangeable bases (EBs) measured were Ca⁺, Mg⁺, Na⁺, and K⁺ and were between 2–101, 0.1–20, 0.01–0.12 and 0.1–1.3 cmol+ kg⁻¹, respectively. The concentrations of Fe, AI and Mn oxides were determined to be between 4,776–87,280, 170–15,863 and 18–6,896 mg kg⁻¹, respectively. The role of oxides is very important, as certain associations, such as Cr(III) with Mnoxides, can induce oxidation to Cr(VI) (Garnier et al., 2013). The diverse soil characteristics make these sites ideal for studying the links between PTE BAc, soil characteristics and PTE properties.

3.1.3.2. Cr and Ni solid-phase distribution in the soils studied

The results for the solid-phase distribution of Cr and Ni in the soil samples are shown in Figure 1, and SM1 presents the differences between the mean distributions in anthropogenic and geogenic soils. Figure 1a shows the general solid-phase distribution of Cr and Ni among the four fractions, while Figure 1b shows the specific distribution in each soil, differentiating the soil origin. Values are expressed as the percentage of pseudototal concentrations for each PTE.

Cr was mainly present in the residual fraction (Figure 10), with 29 to 96% of the Cr bound to F4 (mean 69%). Cr tended to be more prevalent in F3 (3–55%; mean 23%) than in F2 (0.1–29%; mean 8%). Cr was virtually absent in F1 (< 1.5%). When comparing the Cr distribution in soils with anthropogenic and geogenic PTE origins (Figure 10), a similar distribution pattern was shown for both sources, where most Cr was found in F4 and virtually no Cr was found in F1. However, the proportion of Cr bound to F2 and F3 was significantly lower, and the Cr bound to the residual fraction was greater in Cr-enriched soils (F2: 2%; F3: 12%; and F4: 86%) than anthropogenically contaminated soils (F2: 11%; F3: 27%; and F4: 61%) (SM1). As the contamination of these soils was not very recent, it is possible that the absence of Cr in F1 may be the result of rapid leaching of Cr after its release into the environment, before it had time to pass into the less mobile phases.

Ni was also mainly present in the residual fraction F4 (Figure 10), with values ranging from 26 to 96% (mean 64%). Ni was more likely to be found in F2 (2–51%; mean 23%) than in F1 (0.3–24%; mean 5%) or F3 (1–42%; mean 11%). When comparing the Ni distribution in soils with anthropogenic and geogenic PTE origins (Figure 10), a similar distribution pattern was shown for both origins, where most Ni was found in F4. However, the proportion of Ni bound to F1 and F2 was significantly lower, and the

92

Ni bound to the residual fraction was greater in geogenic soils (F2: 6%; F4: 84%) than in anthropogenic soils (F2: 25%; F4: 56%) (SM1).

In contrast to Cr, Ni was found in all estimated fractions. Since fractions F1 and F2 were more easily solubilized, it can be assumed that Ni was more available than Cr. Mendoza et al., (2017) reported similar distributions in suburban soils, where Cr was mainly present in the residual fraction (F4) or in the oxidable fraction (F3) and was absent from the soluble (F1) and reducible (F2) fractions; additionally, Ni was mainly found in F4 followed by F3, and to a lesser extent in F2 (0–15%), and F1 (0–5%). These results provided a general idea of the distribution, but they were not precise, as the recovery was not always 100%. This is in accordance with a study of Zemberyova et al., (2006), in which it was shown that the recovery was lower for Cr and Ni than for other PTEs with the BCR method on Slovak reference material soils.

3.1.3.1. Cr and Ni in vitro oral bioaccessibility

The distributions of Cr and Ni BAc (min, max and mean values expressed in % of pseudototal concentrations) in the soils studied in comparison to the data from the literature are presented in Table 16. Only BAc measured with the UBM was selected for a relevant comparison, as it has been shown that BAc ranges can vary depending on the *in vitro* test used (e.g., Kierulf et al., 2022; Li et al., 2019; Oomen et al., 2002; ...). However, it is important to note that bioaccessibility ranges can also vary depending on the source of contamination, the context of use or the soil matrix. Figure 11 presents the BAc values for each soil sample studied while differentiating their origin.

Country	Information / Uses	ID	Cr tot	Cr VI	Ni tot	pH _{soil}	CaCO₃	ом	P ₂ O ₅	CEC	Ca	Mg	Na	к	Fe oxides	Al oxides	Mn oxides
				mg kg ^{−1}			g kg⁻¹	%	mg kg ⁻¹	cmol+ kg ⁻¹					mg kg⁻¹		
Belgium	Metallurgical site	B1	374	<0.1	238	7.8	516	4	975	18	15	2.1	0.12	0.6	34,670	560	724
	Former steel	MF1	2,902	404.1	41	8.4	21	10	50	28	27	0.5	0.03	0.6	9,606	378	81
	site	MF2	424	6.5	79	8.2	390	20	59	32	30	0.6	0.02	0.6	15,224	463	99
	Spoil tip	MF3	2,758	13.4	2,044	9.3	34	5	67	34	28	5.5	0.07	0.3	12,325	891	717
	Chromo plating	MF4	653	<0.1	26	6.0	<0.1	12	<6	23	20	1.8	0.03	0.7	11,379	518	412
	plant	MF5	12,175	745.8	122	7.7	1	3	<6	22	21	0.7	0.00	0.3	5,908	170	61
Motropoliton Franco	plant	MF6	21,079	1011.9	349	8.2	15	4	<6	25	24	0.6	0.02	0.4	12,213	235	107
		MF7	775	1.7	281	7.1	72	23	94	35	33	1.7	0.02	1.0	55,945	1573	251
		MF8	1,220	0.7	1,790	7.6	51	17	36	55	53	1.2	0.01	0.8	33,413	458	654
	Urban	MF9	717	0.9	830	7.3	17	18	53	56	54	1.3	0.02	0.9	23,760	866	606
wieli opolitari France	wasteland	MF10	1,019	<0.1	447	6.9	6	23	<6	47	43	2.5	0.02	1.2	41,703	1547	387
	wastelatiu	MF11	1,901	<0.1	959	6.9	3	19	380	50	47	1.9	0.02	0.7	78,354	687	1,168
		MF12	1,020	1.1	850	6.4	18	13	390	43	40	2.1	0.03	0.9	13,633	780	630
		MF13	1,887	1.0	2,067	7.1	262	21	121	46	43	2.4	0.01	0.8	38,843	602	665
	Inductrial cito	MF14	157	1.3	51	9.1	90	7	317	51	37	13.8	0.09	0.3	10,918	467	1,497
	industrial site	MF15	31	1.6	283	7.5	148	1	46	10	10	0.1	0.03	0.2	5,185	354	24
	WWTP sludge	MF16	42	<0.1	451	7.3	4	6	1,143	18	17	0.7	0.02	0.4	4,776	223	46
	Slag heap	MF17	378	0.1	22	7.9	34	12	2,383	80	76	2.9	0.04	1.2	4,926	636	18
	Urban area	MF18	159	2.5	44	7.8	83	7	1,173	36	33	1.6	0.06	1.1	12,927	599	312
France DROM	Geogenic	FD1	347	<0.1	312	5.8	5	27	7	10	6	4.1	0.08	0.3	38,246	15,659	667
(Reunion)	Geogenic	FD2	346	<0.1	60	5.1	77	23	<6	2	2	0.1	0.03	0.2	87,280	15,863	454
France DROM (New	Geogenic	FD3	18,494	119.5	11,663	6.2	<0.1	13	<6	3	2	0.6	0.03	0.1	17,344	667	6,896
Caledonia)	Geogenic	FD4	15,523	17.7	7,974	6.3	34	18	<6	15	11	4.3	0.07	0.2	23,434	3870	3,832
Greece	Geogenic	GR1	786	4.8	1,732	7.5	1	7	7	48	28	19.6	0.08	0.6	11,636	218	621
UIEELE	serpentine	GR2	886	1.0	2,356	6.8	2	12	25	37	16	20.0	0.04	1.0	13,403	584	1,094
Northorn Iroland	Geogenic	NI1	522	7.4	264	5.2	3	18	11	25	19	4.6	0.18	0.7	53,370	5,151	1,109
Northern Ireland ba	basalt	NI2	502	0.9	385	6.3	3	34	107	104	101	1.8	0.25	1.3	32,166	8,410	37

Table 16. Soil parameters, pseudototal concentrations of Cr and Ni, and speciation of Cr for the 27 soil samples

CaCO₃: Calcium carbonate; OM: organic matter; P₂O₅: assimilable phosphorus; CEC: cation-exchange capacity; WWTP: wastewater treatment; <x: below the quantification limit; B: Belgium; MF: metropolitan France; FD: France DROM; GR: Greece; and NI: northern Ireland)





(F1: exchangeable, water- and acid-soluble fraction, F2: reducible fraction, F3: oxidizable fraction, F4: residual fraction; B: Belgium; MF: Metropolitan France; FD: France DROM; GR: Greece; and NI: northern Ireland)

			Cr (%)					Ni (%)						
		G				GI			G			GI		
Reference	n	min	max	mean	min	max	mean	min	max	mean	min	max	mean	
Our study	27	0.06	80.2	10.0	0.04	4.6	1.2	1.2	58.3	16.7	0.8	44.7	12.8	
Barsby et al., (2012)	91	0.4	5.4	1.1	0.4	4.4	1	1.4	43.8	12.1	0.6	14.5	5.5	
Bourliva et al., (2021)	34	0.5	2.8	1.4	0.3	1.8	0.5	6	15	10	6	12	9	
Broadway et al., (2010)	27	0.8	31.4	5	0.1	12.6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
Fernández-Caliani et al., (2019)	5	2	8	4.6	1	3	1.8	1	20	17	11	19	14.9	
Fernández-Caliani et al., (2020)	10	nd	1	0.7	nd	1	0.5	nd	10	6.8	nd	10	6.8	
Mehta et al., (2019)	3	1	6	2.7	nd	nd	nd	5	21	12.5	nd	nd	nd	
Mehta et al., (2020)	3	3	7	4.3	nd	nd	nd	12	48	28.6	nd	nd	nd	
Palmer et al., (2014)	145	0.03	5.4	1.3	nd	nd	nd	1.4	46.3	15.2	nd	nd	nd	
Qin et al., (2016)	2	nd	4	nd	nd	4	nd	nd	30	nd	15	30	nd	
Różański et al., (2021)	36	nd	nd	5.8	nd	nd	3.7	nd	nd	23.5	nd	nd	6.1	
Wragg et al., (2017)	27	3	31	7.6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
Zhong and Jiang (2017)	10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	8.6	54.4	24.2	7.7	17.1	12.6	

Table 17. Bioaccessibility (expressed in % of the pseudototal concentrations) measured in our study in comparison to the data from the literature for Cr and Ni assessed by the UBM test.

G: gastric phase; GI: gastrointestinal phase; and nd: not determined.



Figure 11. Bioaccessible fractions of Cr and Ni (mean and standard deviation values expressed in % of pseudototal concentrations; n = 3) in the gastric (G) and gastrointestinal (GI) phases in comparison to the pseudototal concentrations (expressed in mg kg⁻¹)

B: Belgium; MF: Metropolitan France; FD: France DROM; GR: Greece; and NI: northern Ireland)

Chromium

The BAc of Cr ranged from 4 to 638 mg kg⁻¹ in the G phase and from 1 to 188 mg kg⁻¹ in the GI phase. Expressed in % of the pseudototal concentrations, the mean values of BAc of Cr during the G phase were 10% and decreased to 1.2% in the GI phase. The Cr in the study soils was mostly Cr(III), which corresponds to the cationic form (Table 16). With the exception of the MF17 soil, which had a BAc of 80% in the G phase, our results are consistent with the findings of the literature on the percentages of BAc (Table 17). The soils studied were also differentiated according to their geogenic or anthropogenic origin to determine whether this parameter affects BAc (Figure 10), and differences in means were analysed and are shown in SM1. In geogenic soils, the BAc of Cr in the G phase was 1.7% on average, and that in the GI phase was 0.6%. In anthropogenic soils, the BAc of Cr in the G phase was 13% on average, and in the GI phase it was 1% on average. Globally, Cr BAc was significantly lower for geogenically enriched soils than for anthropogenic soils (SM1).

In our study, the BAc of Cr was always greater in the G phase than in the GI phase. The BAc in the GI phase was very low, which means that almost all the Cr solubilized in the G phase precipitated, complexed or readsorbed, which was the result of the increase in the pH of the solution, which changed from acidic to neutral (Fernandez-Caliani et al., 2019). The same partition was also observed by other studies when the UBM test was used (Table 17). However, for other in vitro tests (e.g., SBRC and PBET), a higher Cr concentration was sometimes observed in the GI phase than in the G phase (Karadaş et al., 2011; Mendoza et al., 2017; Pereira et al., 2020). Indeed, various in vitro methods influence bioaccessibility (Billmann et al., 2023; Kierulf et al., 2022). For other tests, the pH in the GI phase was adjusted to 7, which is slightly greater than that for the UBM test (pH GI = 6.3) and could therefore influence the behaviour of a redox-sensitive PTE such as Cr. The higher the pH of the environment in which Cr is found, the more likely it is that redox equilibrium will lead to the formation of Cr(VI), which could explain the higher BAc in the GI phase of the tests in which the pH was adjusted to 7. These differences could also be linked to variations in the digestive fluid compositions of in vitro tests. It is possible that the more complex composition of the GI phase in the UBM test was responsible for this much greater Cr readsorption than in the other in vitro tests with fewer constituents in the GI phase.

The influence of the pseudototal concentration, Cr(VI) content, soil physicochemical parameters and distribution among soil phases on Cr and Ni BAc was analysed by Spearman correlation, and the rank correlation coefficients (r) are presented in Table 3. A second Spearman correlation was performed to separate anthropogenic from geogenic enriched soils, and the results are shown in the supplementary material (Table SM1). When correlations are carried out on smaller samples (e.g. when anthropogenic and geogenic soils are analysed separately), it is important to remain cautious and not overinterpret correlations. Nevertheless, these correlations can still provide information on trends, insofar as the Spearman test correlations are significant (p<0.05).

	Cr G	Cr GI	Ni G	Ni GI
Cr	-0.49	-0.47	-0.28	-0.26
Ni	-0.56	-0.40	-0.37	-0.32
CrVI	-0.31	-0.26	-0.19	-0.08
рН	0.48	0.21	0.60	0.65
P ₂ O ₅	0.57	0.27	0.49	0.46
CaCO₃	0.60	0.16	0.57	0.59
MO	-0.06	-0.06	-0.40	-0.50
CEC	0.26	0.03	0.15	0.13
Ca⁺	0.36	0.14	0.21	0.17
Mg⁺	-0.10	-0.26	-0.11	-0.09
Na⁺	-0.05	-0.07	-0.24	-0.21
K ⁺	0.29	0.09	0.19	0.13
Fe oxides	-0.19	-0.13	-0.37	-0.43
Al oxides	-0.08	-0.25	-0.39	-0.45
Mn				
oxides	-0.46	-0.36	-0.39	-0.37
F1	0.46	0.74	0.83	0.81
F2	0.59	0.74	0.72	0.76
F3	0.53	0.53	0.55	0.53
F4	-0.62	-0.70	-0.85	-0.85
F1+F2	0.59	0.74	0.80	0.83
F1+F2+F3	0.62	0.70	0.85	0.85

 Table 18. Spearman correlation between BAc Cr and Ni (G and GI phases), soil physicochemical parameters and their distributions (n = 27)

The blue colour indicates a negative correlation, the orange colour indicates a positive correlation, and the values in bold are significant at the 0.05 level. F1: exchangeable, water- and acid-soluble fractions, F2: reducible fraction, F3: oxidizable fraction, F4: residual fraction; and F1+F2 and F1+F2+F3 are the added percentage extraction PTE in each fraction.

Considering all 27 soils, a negative correlation was found between pseudototal Cr and bioaccessible Cr in both phases (G: r = -0.49; GI: r = -0.47, p < 0.05; Table 3). This negative correlation can be explained by the mostly low Cr BAc, particularly for highly contaminated soils such as geogenic soils or anthropogenic soils such as MF3, MF8 and MF13. Indeed, the negative correlation was much greater when considering only geogenic enriched soils (G: r = -0.81; GI: r = -0.74, p < 0.05) (Table SM1), which is consistent with studies showing that the bioaccessibility of geogenic PTEs tends to be low (Barsby et al., 2012; Fernandez-Caliani et al., 2020; Juhasz et al., 2007). Moreover, soils MF14, MF17 and FM18 (anthropogenic sources) had high G BAc and among the lowest pseudototal concentrations which could be responsible for the negative correlation with anthropogenic soils (G: r = -0.56, p < 0.05) (Table SM1).

The Spearman analysis only revealed the influence of the soil parameters on the BAc of Cr in the G phase (Table 3). In the GI phase, Cr BAc was always <4%, which might explain why the influence of the soil parameters was limited, and no correlation was detected. The BAc of Cr in the G phase was positively correlated with soil pH, P_2O_5 and CaCO₃ (Cr G: r = 0.48; r = 0.57; r = 0.60, p < 0.05). The

influence of soil pH and CaCO₃ might be linked because a high soil pH often also indicates a higher CaCO₃ content. As the pH of the extraction solution is adjusted to 1.2 with HCl in the G phase, a high soil pH and CaCO₃ content indicates that more HCl needs to be added to adjust the pH of the solution. As carbonates are easily dissolved in the acidic environment of the G phase, the Cr contained inside is released, and the Cr becomes more bioaccessible. Considering all soils, the results showed that a high P₂O₅ concentration induced a greater BAC; this is in accordance with a study by Li et al., (2017), in which they observed an increase in As BAc when phosphate was added, demonstrating that phosphate can influence BAc, but more research is needed to confirm this positive correlation. Among the analysed oxides, only the Mn-oxide content had a negative influence on Cr BAc in the G phase (G: r = -0.46, p < 0.05) (Table 18), whereas oxides are normally known to represent retention sites that limit BAc. The influence might be diluted by other mechanisms, such as stronger affinities for with other soil components. The study of the mineralogy though Xray diffraction (XRD) analysis might help to better understand the interactions between Cr and the different types of oxides as seen in a study by Cox et al., (2017).

Considering all the soils, no significant correlation between the Cr(VI) content and bioaccessible Cr (%) was detected (Table 3). Because many of them contained less than 1 mg of Cr(VI) kg⁻¹, a second Spearman correlation was carried out considering only the 11 soils containing a Cr(VI) concentration greater than 1 mg kg⁻¹ (data not shown). It is important to recognize the weakness of this study resulting from the insufficient sample size, which makes it impossible to draw definite conclusions. It does, however, raise the possibility of future studies. The results showed that the Cr(VI) content seemed to have an influence on bioaccessible Cr, especially in the GI phase where the positive correlation was significant (r = 0.87, p < 0.05). The acidic environment of the G phase may favour the reduction of Cr(VI) to Cr(III) (Broadway et al., 2010). The freshly reduced Cr(III) in the G phase could become more bioaccessible in the GI phase than the original Cr(III), which may form more stable complexes or absorb on soil matrix compounds. Even if the solution pH increases to 6.3 in the GI phase, the Eh-pH diagram shows that at this pH, only a small amount of Cr(VI) to Cr(VI) (Hlihor et al., 2009).

Among the parameters that can explain Cr BAc, the distribution by sequential extraction can help to better clarify the soil physicochemical parameters. As seen before, the general distribution of Cr in the four fractions of the sequential extraction order was ranked as follows: F4 >> F3 > F2 >> F1. For geogenically enriched soils, the low BAc could be explained by the high Cr content found in the residual fraction F4; this is consistent with the negative correlation found between the F4 fraction and bioaccessible Cr in both fractions (Cr G: r = -0.93; GI: r = -0.86, p < 0.05) (Table SM1). However, for anthropogenically contaminated soils, the distribution in F4 was not always consistent with that of Cr

100

BAc in the G phase (Table SM1). In MF1, MF2, MF4, MF8, MF9, and MF13, Cr had a low BAc (< 10%), even if Cr was not mostly located in the residual fraction. In those soils, Cr was mostly found in F3 bound to oxidizable compounds, as most Cr was in the Cr(III) oxidation form, which can form strongly stable complexes with the carboxyl group in OM (Stewart et al., 2003); this could explain the low BAc. Considering all soils, when comparing the patterns of distribution (Figure 10) and BAc (Figure 11), bioaccessible Cr seemed to be related to its distribution in F2 and, to a lesser extent, in F3. This finding is consistent with the positive correlations found between bioaccessible Cr and F2 (G: r = 0.59; GI: r = 0.74, p < 0.05) and F3 (G: r = 0.53; GI: r = 0.53, p < 0.05) (Table 18). Bioaccessible Cr was probably associated with reducible soil compounds, i.e., Fe/Mn oxyhydroxides and oxidable soil compounds, i.e., organic matter.

The highest BAc was observed in MF17, with a percentage of 80% in the G phase, whereas 81% of Cr was contained in the F4 fraction which generally corresponds to the least mobile fraction. In the GI phase, BAc decreased to 0.2%. This soil sample was characterized by the highest content of P_2O_5 (Table 1). Phosphate compounds might be dissolved in the acidic G phase, and at higher pH in the GI phase, the dissolved phosphate could precipitate with dissolved PTEs, explaining the wide variation in bioaccessibility between these two phases (Gron and Andersen, 2003). The inconsistency between the high Cr BAc in the G phase and the main distribution in the residual fraction can be explained by the difference in acid used in the sequential extraction protocol: acetic acid (0.11 M) and the hydrochloric acid used to adjust the pH (1.2) in the bioaccessibility tests. As hydrochloric acid is stronger than acetic acid, it is possible that the extractants used in the sequential extraction are not strong enough to solubilize the Cr in the soil and that only mineralization (F4) was able to extract the Cr from the soil matrix. In fact, this inconsistency may reflect the limitations of sequential extraction methods including a lack of efficiency and selectivity of extractants, readsorption or precipitation of target species after mobilization, and changes in the valence of redox-sensitive target species during extraction. Indeed, sequential extractions provide operationally defined speciation data that generally reflect trends and major differences in PTE speciation among different soils but do not necessarily provide accurate estimates of concentrations of the various target species. Inconsistencies have already been observed in comparison to Cr speciation studies using synchrotron X-ray techniques (Elzinga et al., 2010).

Nickel

The bioaccessible concentrations of Ni (Figure 11) ranged from 1 to 431 mg kg⁻¹ in the G phase and from 1 to 412 mg kg⁻¹ in the GI phase. Expressed in % of the pseudototal concentrations, the mean values of the BAc of Ni during the G phase were 17% and decreased to 13% in the GI phase (Figure 11, Table 17). In the geogenic soils, the average BAc Ni content in the G phase was 4% and that in the GI

phase was 3%. In anthropogenic soils, the average BAc of Ni in the G phase was 23% and that in the G phase was 17%.

For all soils, the BAc of Ni was not dependent on the pseudototal concentration (Table 18) but was positively correlated with soil pH, P_2O_5 and CaCO₃ (Ni G: r = 0.60; r = 0.49; r = 0.57; Ni GI: r = 0.65; r = 0.46; r = 0.59, p < 0.05) and negatively correlated with OM (Ni G: r = -0.40; Ni GI: r = -0.50, p < 0.05). The same influence of OM was observed in a study by Palmer et al., (2013). This can be explained by the retention of the cationic element on negatively charged OM sites (Cempel and Nikel, 2006). No correlation was found for Cr indicating that Ni might have a greater affinity for OM than Cr in its cationic form. For Cr, the influence of soil pH and CaCO₃ might be linked and a high P_2O_5 could be responsible for a higher BAc, however, further research needs to be conducted on the influence of phosphorus on BAc. All analysed oxides were negatively correlated with Ni BAc in both phases (Table 18). Indeed, oxides are known to represent good retention sites for PTEs. When considering anthropogenic and geogenic enriched soils, virtually no correlation was found between Ni BAc and soil parameters except for OM in geogenic soils (G: r = -0.76; GI: r = -0.95, p < 0.05) (Table SM1); this emphasizes that the influence of soil parameters is highly complex and can vary from one study to another and from one source of contamination to another.

Usually, divalent metallic cations, such as Cd and Pb, are extracted more in the G phase and have a tendency to reprecipitate, reform complexes or readsorb in the GI phase (Ellickson et al., 2001). However, in some soils, the BAc of Ni in the G phase was equal to that in the GI phase (Figure 11), e.g., B1, MF1, MF2, MF3, MF5, MF14 and MF15. MF12 and geogenic enriched soils also seem to have equal Ni extracted in G and GI but as bioaccessibility is very low in these soils, it is difficult to determine whether the difference is significant. To more thoroughly clarify the mechanisms behind this partition, relationships with the soil physicochemical parameters were studied by considering the ratio between the BAc of Ni in the G phase and that in the GI phase (Table 19).

paramet	рН	P_2O_5	CaCO₃	OM	CEC	Ca⁺	Mg⁺	Na ⁺	K+	Fe oxides	Al oxides	Mn oxides
BAc Ni(G/GI)	-0.62	0.01	-0.34	0.63	0.21	0.21	0.10	0.00	0.39	0.44	0.51	0.11

 Table 19.
 Spearman correlation between the BAc G/BAc GI ratio and soil physicochemical parameters

The BAc G/BAc GI for Ni was negatively correlated with soil pH (r = -0.62, p < 0.05) and positively correlated with OM, K+ and Fe- and Al-oxide contents (r = 0.63, r = 0.39, r = 0.44 and r = 0.51, respectively, p < 0.05). The BAc of Ni in the G and GI phases tended to be equal in soils with higher soil pH and lower OM and Al-oxide contents. It can be assumed that a higher soil pH can induce the addition of more HCl to adjust the pH to 1.2 in the G phase, which could promote the formation of

soluble NiCl₂ complexes in the GI phase rather than insoluble complexes with soil matrix compounds. Another hypothesis is that there might be competition with other cations or compounds (salts) in the GI fluids making the readsorption, precipitation or complexation more complicated. Indeed, the Ni adsorption affinity on oxides was weaker than that for Cr and Pb (Young et al., 2013), and both PTEs had high concentrations in studied soils (Table 10).

Among the parameters that can clarify Ni BAc, the distribution can help provide a better understanding in addition to soil physicochemical parameters. The order of the distribution of Ni in the four fractions was ranked as follows: $F4 \gg F2 \ge F3 > F1$. Similar to Cr, the globally low BAc could therefore be explained by the high Ni content found in the residual fraction; this is consistent with the significant negative correlation found between F4 and bioaccessible Ni in both phases (Ni G: r = -0.85; GI: r = -0.85, p < 0.05) (Table 18). Considering geogenically enriched soils, bioaccessible Ni was best explained by F1+F2 (G: r = 0.76; GI: r = 0.95, p < 0.05) (SM1), indicating that bioaccessible Ni was associated with exchangeable and reducible compounds. However, in anthropogenically contaminated soils, bioaccessible Ni seemed to be less elucidated by its association with F2 reducible compounds than by its association with F1 and F3 (F1 G: r = 0.69; GI: r = 0.65; F2 G: r = 0.70; GI: r = 0.64, p < 0.05) (Table SM1). Depending on the origin of the contamination, the associations seemed to differ slightly.

Comparison of Cr and Ni

When a distinction is made between soils of geogenic and anthropogenic origin (Figure 10), it appears that Cr and Ni BAc were generally lower for soils with naturally occurring PTEs (SM1). This is explained by the high proportion of Cr and Ni found in the residual fraction compared to the other fractions and the many immobilization mechanisms over time, as shown by several studies on BAc (Barsby et al., 2012; Chu et al., 2022; Ding et al., 2022; Fendorf et al., 2004; Ljung et al., 2007; Rinklebe and Shaheen, 2017, Stewart et al., 2003; Young et al., 2013). For anthropogenically contaminated soils, the association of Cr and Ni with the more mobile fractions (F1, F2 and F3) was more pronounced, explaining the tendency towards higher BAc (Figure 10). However, considering the different sources among anthropogenic soils (i.e., urban wastelands, industrial sites, and mining areas), the limited number of available samples did not allow us to identify the influence of the source on bioaccessibility. As most soils studied were industrial, the comparison with the other contexts was therefore not particularly relevant because it was not necessarily representative. However, a meta-analysis by Kierulft et al., (2022) revealed that Cr had greater G phase BAc in industrial and urban soils than in mining, agricultural or rural soils.

In the present study, the BAc of Cr and Ni was generally low, and both in the literature and in this study, Cr tended to be less bioaccessible than Ni (Figure 11; SM2). Indeed, the sequential extraction showed that Ni tended to be present in more easily available fractions (e.g., F1, F2) than Cr (Figure 10). This is consistent with a study by Cox et al., (2017), in which an analysis of the mineralogy showed that Ni was more widely dispersed within the soils, with a proportion of pseudototal Ni found in more easily soluble compounds (carbonates and weathering products: secondary iron oxides and precursor clay minerals) when Cr concentrations were principally related to noneasily solubilized compounds (e.g. recalcitrant chrome spinel and primary iron oxides).

In our study, only a few correlations between soil matrix compounds and BAc were established and varied according to the contamination origin. Similar results were observed in a study by Różański et al., (2021). A previous literature review showed that BAc seems to be site dependent. The influence of a single soil parameter or statistical model mostly differs from one study to another (Billmann et al., 2023). Soil matrices are complex, and many reactions can occur within them. Soil compounds can influence the bioaccessibility of Cr, Ni, and each other. In addition, the PTEs present can modify the bioaccessibility of other PTEs by competing with each other for adsorption sites.

3.1.3.4. Evaluation of the ability of the single-extraction method with HCl to predict the BAc of Cr and Ni

Because a previous study showed the efficiency of using HCI (0.65%) in a first-tier screening to predict the BAc of As, Cd, and Pb in both the G and GI phases (Pelfrêne et al., 2020), this single extraction method was assessed for Cr and Ni. The study of the correlation between the HCl concentration and the UBM for Cr and Ni provided additional information on a validated and standardized method (UBM for As, Cd, and Pb) or on methods in progress (HCl) to begin extending their fields of use to these two PTEs. Figure 12 presents the results obtained for the extractable concentrations of Cr and Ni by HCl in comparison with the pseudototal concentrations. The extractable Cr and Ni concentrations ranged from 6 to 1,531 mg kg⁻¹ and 2 to 829 mg kg⁻¹, respectively, and the extractable percentages of the pseudototal Cr and Ni concentrations ranged from 0.1 to 87% and 2 to 79% respectively. The extractable concentrations of Cr and Ni by HCl were slightly greater than those for the UBM G phase, but globally, both patterns were similar. The relationships between the extractable concentrations of Cr and Ni by using the UBM in the G and GI phases and those by HCl were investigated and are presented in Figure 13. The best relationships were for Ni in both phases (G: $R^2 = 0.96$ and GI: $R^2 =$ 0.94). In the G phase, the relationship for Cr was also good ($R^2 = 0.93$), but in the GI phase, the relationship was weaker ($R^2 = 0.45$). Ni has a cationic behaviour, similar to that of Cd and Pb, in which the HCl test also had a good relationship with the UBM test (Pelfrêne et al., 2020). Cr BAc in the GI phase was low compared to that in the G phase due to several processes of complexation, precipitation, and readsorption in the higher pH environment of the intestinal compartment. Indeed, the acidic environment with this single extractant could explain the poor relationship between the extractable concentrations of HCl and the UBM GI phase. This poor correlation was mainly due to two soil samples (MF7 and MF17). Indeed, when these two points were removed, the relationship was much better with an R² value of 0.80, because the amount of extracted Cr in the GI phase was practically \leq 1 when the amount of extracted Cr in the G phase was 211 and 303 mg kg⁻¹ and the amount of extracted Cr with HCl was 357 and 329 mg kg⁻¹ for FM7 and FM17, respectively. FM7 was characterized by a high OM content (23%) and high iron-oxide content (56 g kg⁻¹). FM17 was characterized by a high P₂O₅ (2.4 g kg⁻¹) content, high CEC and exchangeable Ca⁺ (80 and 76 cmol+ kg⁻¹, respectively). No distinguishable differences were found between the physicochemical parameters of the analysed soils. Qian et al., (2024) showed that in the G phase, the transformation of Cr(VI) to Cr(III) could be the main process, while in the GI phase could be explained by strong reprecipitation due to increased solution pH.





Figure 12. Extractable concentrations of Cr and Ni by HCl (expressed in mg kg⁻¹ and%) in comparison with the pseudototal concentrations (expressed in mg kg⁻¹)



Figure 13. Relationships between extractable concentrations of Cr and Ni by the UBM in the gastric (G) and gastrointestinal (GI) phases and those by HCl. All extracted concentrations are expressed in mg kg⁻¹

Table 20 summarizes the regression models for Cr and Ni predicting bioaccessible concentrations in the G and GI phases from extractable concentrations by HCl. At first glance, this simplified test seems promising for predicting the BAc of Cr and Ni in both phases (to a lesser extent Cr in GI) and needs to be reinforced with a larger number of soil samples.

 Tableau 20. Regression models for Cr and Ni representing bioaccessible concentrations with the UBM in the gastric (G) and gastrointestinal (GI) phases as a function of extractable concentrations by HCI

Element	n	Phase	Equation	R
Cr	27	G	$log10[Cr]_{UBM} = 0.92 log10[Cr]_{HCI} - 0.08$	0.93
	27	GI	$log10[Cr]_{UBM} = 0.62 log10[Cr]_{HCI} - 0.34$	0.45
	25	GI	$log10[Cr]_{UBM} = 0.81 log10[Cr]_{HCI} - 0.56$	0.80
Ni	27	G	$log10[Ni]_{UBM} = 1.02 log10[Ni]_{HCI} - 0.20$	0.96
	27	GI	log10[Ni] _{UBM} = 1.07 log10[Ni] _{HCI} - 0.42	0.94

3.1.4. Conclusion

This paper presents an investigation of the oral BAc of Cr and Ni in 27 soil samples collected from various sites, including those of anthropogenic and geogenic origins, as well as from different environmental contexts, such as industrial, mining, and urban areas, and revealed a wide range of concentrations and soil physicochemical parameters. The results indicated that the BAc values of Cr and Ni were generally low, with values below 20% and 30%, respectively. BAc tended to be more variable for anthropogenic soils, whereas for geogenically enriched soils, BAc was always very low. Among the various soil parameters analysed in our study, factors such as soil pH, assimilable phosphorus, carbonates, organic matter, and oxides influenced the BAc of Cr and/or Ni. It is worth noting that these influencing parameters may vary from one study to another, as indicated in the literature. The influence of soil parameters is obvious, but distinguishing the influence of each parameter is very complicated because they may themselves be correlated. The distribution of Cr and Ni within the various soil-bearing phases revealed that these elements were predominantly associated with the residual fraction, which largely explains their limited BAc. Aside from the residual fraction, Cr was primarily found in the oxidizable fraction and was absent in the acid soluble fraction. In contrast, Ni was more prevalent in the reducible fraction and was distributed across all the fractions in the anthropogenically contaminated soils. Compared with physicochemical parameters, sequential extractions offered a more comprehensive explanation for BAc. However, for certain specific soils, mineralogical studies are recommended as a complement to overcome the limitations of sequential extraction. This study is of interest for assessing the potential use of the simplified HCl test as a first approach to predict the BAc of Cr and Ni in both phases. The results obtained for these 27 soil samples are very promising, although further research is required to refine the applicability of these results to a larger soil population and, more specifically, for certain Cr-contaminated soils. Globally, the results emphasize the importance of assessing the oral BAc of Cr and Ni to better assess human exposure, refine risk and adopt more effective soil management practices.

3.1.5. References

ATSDR. (2005). Toxicological Profile for Nickel. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

ATSDR. (2012). Toxicological Profile for Chromium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

Ayangbenro, A. S., & Babalola, O. O. (2017). A New Strategy for Heavy Metal Polluted Environments : A Review of Microbial Biosorbents. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(1), 94. <u>https://doi.org/10.3390/ijerph14010094</u> Babaahmadifooladi, M., Jacxsens, L., Van de Wiele, T., & Laing, G. D. (2020). Gap analysis of nickel bioaccessibility and bioavailability in different food matrices and its impact on the nickel exposure assessment. *Food Research International*, *129*, 108866. <u>https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108866</u>

Bagherifam, S., Brown, T. C., Fellows, C. M., & Naidu, R. (2019). Bioavailability of Arsenic and Antimony in Terrestrial Ecosystems : A Review. *Pedosphere*, *29*(6), 681-720. <u>https://doi.org/10.1016/S1002-0160(19)60843-X</u>

Barsby, A., McKinley, J. M., Ofterdinger, U., Young, M., Cave, M. R., & Wragg, J. (2012). Bioaccessibility of trace elements in soils in Northern Ireland. *Science of The Total Environment*, *433*, 398-417. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.05.099</u>

Billmann, M., Hulot, C., Pauget, B., Badreddine, R., Papin, A., & Pelfrêne, A. (2023). Oral bioaccessibility of PTEs in soils : A review of data, influencing factors and application in human health risk assessment. *Science of The Total Environment*, *896*, 165263. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165263</u>

Bourliva, A., Aidona, E., Papadopoulou, L., Ferreira da Silva, E., & Patinha, C. (2021). Levels, oral bioaccessibility and health risk of sand-bound potentially harmful elements (PHEs) in public playgrounds : Exploring magnetic properties as a pollution proxy. *Environ. Pollut.*, 290, 118122. <u>https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118122</u>

Broadway, A., Cave, M. R., Wragg, J., Fordyce, F. M., Bewley, R. J. F., Graham, M. C., Ngwenya, B. T., & Farmer, J. G. (2010). Determination of the bioaccessibility of chromium in Glasgow soil and the implications for human health risk assessment. *Science of The Total Environment*, 267-277. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.09.007

Cempel, M., & Nikel, G. (2006). Nickel : A Review of Its Sources and Environmental Toxicology. 15(3), 375-382.

Chu, Z., Lin, C., Yang, K., Cheng, H., Gu, X., Wang, B., Wu, linlin, & Ma, J. (2022). Lability, bioaccessibility, and ecological and health risks of anthropogenic toxic heavy metals in the arid calcareous soil around a nonferrous metal smelting area. *Chemosphere*, *307*, 136200. <u>https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136200</u>

Cox, S. F., Rollinson, G., & McKinley, J. M. (2017). Mineralogical characterisation to improve understanding of oral bioaccessibility of Cr and Ni in basaltic soils in Northern Ireland. *Journal of Geochemical Exploration*, *183*, 166-177. <u>https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2017.02.006</u>

Denys, S., Caboche, J., Tack, K., Rychen, G., Wragg, J., Cave, M., Jondreville, C., & Feidt, C. (2012). In Vivo Validation of the Unified BARGE Method to Assess the Bioaccessibility of Arsenic, Antimony, Cadmium, and Lead in Soils. *Environmental Science & Technology*, *46*, 6252-6260. <u>https://doi.org/10.1021/es3006942</u>

Ding, S., Guan, D.-X., Dai, Z.-H., Su, J., Teng, H. H., Ji, J., Liu, Y., Yang, Z., & Ma, L. Q. (2022). Nickel bioaccessibility in soils with high geochemical background and anthropogenic contamination. *Environmental Pollution*, *310*, 119914. <u>https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119914</u>

Ding, Z., & Hu, X. (2014). Ecological and human health risks from metal(loid)s in peri-urban soil in Nanjing, China. *Environmental Geochemistry and Health*, *36*, 399-408. <u>https://doi.org/10.1007/s10653-013-9568-1</u>

Dudka, S., & Miller, W. P. (1999). Permissible Concentrations of Arsenic and Lead in Soils Based on Risk Assessment. *Water, Air, and Soil Pollution, 113,* 127-132.

Ellickson, K. M., Meeker, R. J., Gallo, M. A., Buckley, B. T., & Lioy, P. J. (2001). Oral Bioavailability of Lead and Arsenic from a NIST Standard Reference Soil Material. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *40*, 128-135. <u>https://doi.org/10.1007/s002440010155</u>

Elzinga, E. J., & Cirmo, A. (2010). Application of sequential extractions and X-ray absorption spectroscopy to determine the speciation of chromium in Northern New Jersey marsh soils developed in chromite ore processing residue (COPR). *Journal of Hazardous Materials*, *183*, 145-154. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.06.130 Fendorf, S., La Force, M. J., & Li, G. (2004). Temporal Changes in Soil Partitioning and Bioaccessibility of Arsenic, Chromium, and Lead. *Journal of Environmental Quality*, *33*, 2049-2055. <u>https://doi.org/10.2134/jeq2004.2049</u>

Fernández-Caliani, J. C., Fernández-Landero, S., & Inmaculada Giráldez, M. (2020). Human bioaccessibility of heavy metals and metalloids naturally occurring at high levels in chestnut grove soils of SW Spain. *Proscience*, *7*, 30-34. <u>https://doi.org/10.14644/ghc2020.005</u>

Fernández-Caliani, J. C., Giraldez, M. I., & Barba-Brioso, C. (2019). Oral bioaccessibility and human health risk assessment of trace elements in agricultural soils impacted by acid mine drainage. 237, 124441. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124441

Garnier, J., Quantin, C., Guimarães, E. M., Vantelon, D., Montargès-Pelletier, E., & Becquer, T. (2013). Cr(VI) genesis and dynamics in Ferralsols developed from ultramafic rocks : The case of Niquelândia, Brazil. *Geoderma*, 193-194, 256-264. <u>https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2012.08.031</u>

Grøn, C., & Andersen, L. (2003). Human Bioaccessibility of Heavy Metals and PAH from Soil; Danish EPA. *Technology Programme for Soil and Groundwater Contamination*, *840*, 113.

Gu, Y.-G., Gao, Y.-P., & Lin, Q. (2016). Contamination, bioaccessibility and human health risk of heavy metals in exposed-lawn soils from 28 urban parks in southern China's largest city, Guangzhou. *Applied Geochemistry*, 67, 52-58. <u>https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2016.02.004</u>

Hack, A., Welge, P., Wittsiepe, J., & Wilhelm, M. (2002). *Aufnahme und Bilanzierung (Bioverfügbarkeit) ausgewählter Bodenkontaminanten im Tiermodell (Minischwein)* (298 73 227/01; p. 324). Umweltbundesamt.

Hlihor, R., Apostol, L., Pavel, V., Smarande, C., Robu, B., Caliman, F., & Gavrilescu, M. (2009). Overview on chromium occurence in the environment and its remediation. *Bulletin of the Polytechnic Institute of Iasi, Section Chemistry and Chemical Engineering*, *3*.

Juhasz, A. L., Smith, E., Weber, J., Rees, M., Rofe, A., Kuchel, T., Sansom, L., & Naidu, R. (2007). In vitro assessment of arsenic bioaccessibility in contaminated (anthropogenic and geogenic) soils. *Chemosphere*, *69*, 69-78. <u>https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.04.046</u>

Karadaş, C., & Kara, D. (2011). In vitro gastro-intestinal method for the assessment of heavy metal bioavailability in contaminated soils. *Environmental Science and Pollution Research*, *18*, 620-628. <u>https://doi.org/10.1007/s11356-010-0404-1</u>

Kelley, M. E., Brauning, S. E., Schoof, R. A., & Ruby, M. V. (2002). *Assessing oral bioavailability of metals in soil*. Battelle Press.

Kierulf, A., Ollson, C., Whitehead, C., Beauchemin, D., & Koch, I. (2022). Literature review and meta-analysis of gastric and intestinal bioaccessibility for nine inorganic elements in soils and soil-like media for use in human health risk assessment. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 240, 113929. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2022.113929

Kumar, P., Gacem, A., Ahmad, M. T., Yadav, V. K., Singh, S., Yadav, K. K., Alam, M. M., Dawane, V., Piplode, S., Maurya, P., Ahn, Y., Jeon, B.-H., & Cabral-Pinto, M. M. S. (2022). Environmental and human health implications of metal(loid)s : Source identification, contamination, toxicity, and sustainable clean-up technologies. *Frontiers in Environmental Science*, *10*, 949581. <u>https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.949581</u>

Li, H.-B., Li, M.-Y., Zhao, D., Li, J., Li, S.-W., Xiang, P., Juhasz, A. L., & Ma, L. Q. (2019). Arsenic, lead, and cadmium bioaccessibility in contaminated soils : Measurements and validations. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, *50*(13), 1303-1338. <u>https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1656512</u>

Li, S.-W., Liu, X., Sun, H.-J., Li, M.-Y., Zhao, D., Luo, J., Li, H.-B., & Ma, L. Q. (2017). Effect of phosphate amendment on relative bioavailability and bioaccessibility of lead and arsenic in contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*, 339, 256-263. <u>https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.06.040</u>

Ljung, K., Oomen, A., Duits, M., Selinus, O., & Berglund, M. (2007). Bioaccessibility of metals in urban playground soils. *Journal of Environmental Science and Health, Part A, 42*(9), 1241-1250. <u>https://doi.org/10.1080/10934520701435684</u>

Lwin, C. S., Kim, Y.-N., Lee, M., & Kim, K.-R. (2022). Coexistence of Cr and Ni in anthropogenic soils and their chemistry : Implication to proper management and remediation. *Environmental Science and Pollution Research*, *29*, 62807-62821. <u>https://doi.org/10.1007/s11356-022-21753-2</u>

Mehra, O.P., Jackson, M.L., (1960). Iron oxide removal from soils and clays by a dithionite-citrate system buffered with sodium bicarbonate. *Clays and Clay Minerals*, 317–327.

Mehta, N., Cipullo, S., Cocerva, T., Coulon, F., Dino, G. A., Ajmone-Marsan, F., Padoan, E., Cox, S. F., Cave, M. R., & De Luca, D. A. (2020). Incorporating oral bioaccessibility into human health risk assessment due to potentially toxic elements in extractive waste and contaminated soils from an abandoned mine site. *Chemosphere*, *255*, 126927. <u>https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126927</u>

Mehta, N., Cocerva, T., Cipullo, S., Padoan, E., Dino, G. A., Ajmone-Marsan, F., Cox, S. F., Coulon, F., & De Luca, D. A. (2019). Linking oral bioaccessibility and solid phase distribution of potentially toxic elements in extractive waste and soil from an abandoned mine site : Case study in Campello Monti, NW Italy. *Science of The Total Environment*, *651*, 2799-2810. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.115</u>

Mendoza, C. J., Garrido, R. T., Quilodrán, R. C., Segovia, C. M., & Parada, A. J. (2017). Evaluation of the bioaccessible gastric and intestinal fractions of heavy metals in contaminated soils by means of a simple bioaccessibility extraction test. *Chemosphere*, *176*, 81-88. <u>https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.066</u>

Oomen, A. G., Hack, A., Minekus, M., Zeijdner, E., Cornelis, C., Schoeters, G., Verstraete, W., Van de Wiele, T., Wragg, J., Rompelberg, C. J. M., Sips, A. J. A. M., & Van Wijnen, J. H. (2002). Comparison of Five In Vitro Digestion Models To Study the Bioaccessibility of Soil Contaminants. *Environmental Science & Technology*, *36*(15), 3326-3334. <u>https://doi.org/10.1021/es010204v</u>

Oomen, A. G., Rompelberg, C. J. M., Bruil, M. A., Dobbe, C. J. G., Pereboom, D. P. K. H., & Sips, A. J. A. M. (2003). Development of an In Vitro Digestion Model for Estimating the Bioaccessibility of Soil Contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *44*, 281-287. <u>https://doi.org/10.1007/s00244-002-1278-0</u>

Palmer, S., Cox, S. F., McKinley, J. M., & Ofterdinger, U. (2014). Soil-geochemical factors controlling the distribution and oral bioaccessibility of nickel, vanadium and chromium in soil. *Applied Geochemistry*, *51*, 255-267. <u>https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2014.10.010</u>

Palmer, S., Ofterdinger, U., McKinley, J. M., Cox, S., & Barsby, A. (2013). Correlation analysis as a tool to investigate the bioaccessibility of nickel, vanadium and zinc in Northern Ireland soils. *Environmental Geochemistry and Health*, *35*, 569-584. <u>https://doi.org/10.1007/s10653-013-9540-0</u>

Paustenbach, D. J. (2000). The Practive Of Exposure Assessment : A State-Of-The-Art Review. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 3(3), 179-291. <u>https://doi.org/10.1080/10937400050045264</u>

Pelfrêne, A., Sahmer, K., Waterlot, C., Glorennec, P., Douay, F., & Le Bot, B. (2020). Evaluation of singleextraction methods to estimate the oral bioaccessibility of metal(loid)s in soils. *Science of The Total Environment*, 727, 138553. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138553</u>

Pereira, W. V. da S., Teixeira, R. A., Souza, E. S. de, Moraes, A. L. F. de, Campos, W. E. O., Amarante, C. B. do, Martins, G. C., & Fernandes, A. R. (2020). Chemical fractionation and bioaccessibility of potentially toxic elements in area of artisanal gold mining in the Amazon. *Journal of Environmental Management*, *267*, 110644. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110644

Qian, Q., Liang, J., Ren, Z., Sima, J., Xu, X., Rinklebe, J., & Cao, X. (2024). Digestive fluid components affect speciation and bioaccessibility and the subsequent exposure risk of soil chromium from stomach to intestinal

phase in in-vitro gastrointestinal digestion. *Journal of Hazardous Materials, 463,* 132882. <u>https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132882</u>

Qin, J., Nworie, O. E., & Lin, C. (2016). Particle size effects on bioaccessible amounts of ingestible soil-borne toxic elements. *Chemosphere*, *159*, 442-448. <u>https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.06.034</u>

Rauret, G., López-Sánchez, J. F., Sahuquillo, A., Rubio, R., Davidson, C., Ure, A., & Quevauviller, Ph. (1999). Improvement of the BCR three step sequential extraction procedure prior to the certification of new sediment and soil reference materials. *Journal of Environmental Monitoring*, 1, 57-61. <u>https://doi.org/10.1039/a807854h</u>

Rinklebe, J., & Shaheen, S. M. (2017). Redox chemistry of nickel in soils and sediments : A review. *Chemosphere*, *179*, 265-278. <u>https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.153</u>

Rodriguez, R. R., Basta, N. T., Casteel, S. W., & Pace, L. W. (1999). An In Vitro Gastrointestinal Method To Estimate Bioavailable Arsenic in Contaminated Soils and Solid Media. *Environmental Science & Technology*, *33*, 642-649. <u>https://doi.org/10.1021/es980631h</u>

Różański, S. Ł., Castejón, J. M. P., & McGahan, D. G. (2021). Child risk assessment of selected metal(loid)s from urban soils using in vitro UBM procedure. *Ecological Indicators*, *127*, 107726. <u>https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.107726</u>

Ruby, M. V., Davis, A., Schoof, R., Eberle, S., & Sellstone, C. M. (1996). Estimation of Lead and Arsenic Bioavailability Using a Physiologically Based Extraction Test. *Environmental Science & Technology*, *30*, 422-430. <u>https://doi.org/10.1021/es950057z</u>

Semple, Kirk. T., Doick, K. J., Jones, K. C., Burauel, P., Craven, A., & Harms, H. (2004). Defining Bioavailability and Bioaccessibility of Contaminated Soil and Sediment is Complicated. *Environmental Science & Technology*, *38*(12), 228A-231A. <u>https://doi.org/10.1021/es040548w</u>

Stewart, M. A., Jardine, P. M., Brandt, C. C., Barnett, M. O., Fendorf, S. E., McKay, L. D., Mehlhorn, T. L., & Paul, K. (2003). Effects of Contaminant Concentration, Aging, and Soil Properties on the Bioaccessibility of Cr(III) and Cr(VI) in Soil. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 12(1), 1-21. <u>https://doi.org/10.1080/713610958</u>

US EPA. (2017). Method 1340 (SW-846 Update VI). United States Environmental Protection Agency.

Wang, M., Xu, X., Han, Q., Lin, X., Yuan, H., Wang, M., Jiang, F., & Wang, W. (2023). Assessment of sourceoriented health risk associated with the oral ingestion of heavy metals in dust within an iron/steel smeltingaffected area of the North China Plain. *Environmental Research*, 237, 117101. <u>https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117101</u>

Wragg, J., Broadway, A., Cave, M. R., Fordyce, F. M., Palumbo-Roe, B., Beriro, D. J., Farmer, J. G., Graham, M. C., Ngwenya, B. T., & Bewley, R. J. F. (2017). Linkage between solid-phase apportionment and bioaccessible arsenic, chromium and lead in soil from Glasgow, Scotland, UK. *Earth and Environmental Science Transactions of the Royal Society of Edinburgh*, *108*(2-3), 217-230. <u>https://doi.org/10.1017/S1755691018000762</u>

Young, S. D. (2013). Chemistry of Heavy Metals and Metalloids in Soils. In B. J. Alloway (Éd.), *Heavy Metals in Soils* (Vol. 22, p. 51-95). Springer Netherlands. <u>https://doi.org/10.1007/978-94-007-4470-7_3</u>

Žemberyová, M., Barteková, J., & Hagarová, I. (2006). The utilization of modified BCR three-step sequential extraction procedure for the fractionation of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn in soil reference materials of different origins. *Talanta, 70*, 973-978. <u>https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.05.057</u>

Zhong, M., & Jiang, L. (2017). Refining health risk assessment by incorporating site-specific background concentration and bioaccessibility data of Nickel in soil. *Science of The Total Environment*, *581-582*, 866-873. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.036</u>

3.1.2. Résultats de la bioaccessibilité sur les autres EM : As, Cd, Pb et Sb

Du fait de la multi-contamination des sols collectés dans le Lot 1 (Tableau 8), les autres EM, à savoir, l'As, le Cd, le Pb et le Sb ont également été mesurés (concentrations totales, bioaccessibilités -tests UBM / HCl- et distributions dans les différentes fractions du sol -extraction séquentielle BCR), dans l'objectif de mettre en avant les grandes tendances et faire le lien avec les données de la littérature présentées dans le Chapitre 1.

Les sols considérés pour les quatre EM de cette étude sont présentés dans le Tableau 21. Le choix a été fait de ne pas considérer les sols pour lesquels les concentrations des extraits du test UBM et du test simplifié HCl, étaient sous les limites de quantification (LQ). En effet, la prise en compte de la valeur de la LQ, à défaut d'avoir une valeur précise, résultait en une concentration trop élevée, biaisant les interprétations.

Pays	Informations sur l'origine de la	ID	Cons	Considéré dans l'étude			
-	contamination		As	Cd	Pb	Sb	
Belgique	Site métallurgique	B1	Х	Х	Х	Х	
France métropolitaine	Ancien site sidérurgique	MF1	Х	Х	Х	Х	
		MF2	Х	Х	Х	х	
	Crassier	MF3	Х	Х	Х	Х	
	Zone boisée près d'une ancienne_usine	MF4			Х		
	de chromage	MF5			Х	Х	
		MF6	Х	Х	Х	Х	
	Friche urbaine	MF7	Х	Х	Х	Х	
		MF8	Х	Х	Х	Х	
		MF9	Х	Х	Х	Х	
		MF10	Х	Х	Х	Х	
		MF11	Х	Х	Х	Х	
		MF12	Х	Х	Х	Х	
		MF13	Х	Х	Х	Х	
	Site industriel	MF14	Х	Х	Х	Х	
		MF15	Х	Х	Х	Х	
	Epandage boues de STEP	MF16	Х	Х	Х	Х	
	Terril	MF17	Х	Х	Х	Х	
	Zone urbaine	MF18	Х	Х	Х	Х	
		MF19	Х	Х	Х	Х	
		MF20	Х	Х	Х	Х	
		MF21	Х	Х	Х	Х	
		MF22	Х	Х	Х	Х	
		MF23	Х	Х	Х	Х	
		MF24	Х	Х	Х	Х	
		MF25	Х	Х	Х	Х	
France DROM (Réunion)	Géogène	FD1	Х	Х	Х	Х	
		FD2	Х	Х	Х	Х	
France DROM (Nouvelle	Géogène	FD3	Х	Х	Х	Х	
Calédonie)		FD4	Х	Х	Х	Х	
Grèce	Géogène - roches de type serpentines	GR1	Х	Х	Х	Х	
		GR2	Х	Х	Х	Х	
Irlande du Nord	Géogène - roches basaltiques	NI1	Х	Х	Х	Х	
		NI2	Х	Х	Х	Х	

Tableau 21. Concentrations totales en As, Cd, Pb et Sb (exprimées en mg kg⁻¹) dans les 34 sols de l'étude

3.2.1. Degré de contamination des 34 sols de l'étude

Les concentrations totales sont présentées dans le Tableau 8 et sont comprises entre 3 et 143 mg kg⁻¹ pour l'As, entre 0,8 et 219 mg kg⁻¹ pour le Cd, entre 5 et 43 664 mg kg⁻¹ pour le Pb et entre 2 et 247 mg kg⁻¹ pour le Sb.

3.1.2.2. Distribution des EM dans les phases porteuses du sol

Globalement, l'As, le Cd et le Sb ont tendance à être majoritairement présents dans la fraction F4 avec en moyenne 72%, 64% et 64% respectivement (Figure 14). Cette fraction correspond à la fraction résiduelle dans laquelle les EM sont les plus fortement retenus car inclus dans la structure cristalline. En dehors de la fraction F4, l'As se distribue principalement entre les fractions F2 et F3 (10% et 15%) qui correspondent aux composés réductibles et oxydables. La fraction F1, fraction échangeable et acido-soluble, est très minoritaire avec seulement 3% de l'As. Le Cd a tendance à être présent dans les fractions F1 et F2 (12% et 19%) et peu présent dans la fraction F3 (5%). Le Sb est distribué de manière similaire entre les fractions F1, F2 et F3 (12%, 14% et 10%). Le Pb est majoritairement distribué dans les fractions F2 et F4 (50% et 35%). En moyenne 14% du Pb est trouvé dans la fraction F3 et il est quasiment absent de la fraction F1 (1%). La synthèse de la distribution est présentée dans le Tableau 22.

Billmann et al., (2023) ont montré que le Cd et le Pb sont généralement plus présents dans les fractions plus ou moins mobiles (F1, F2 ou F3) et dans une moindre mesure dans la fraction F4. Pour le Pb, dans cette étude, sa distribution est majoritaire dans la fraction F2, lié aux composés réductibles, ce qui est en accord avec certaines observations de la littérature (Liang et al., 2016 ; Roussel et al., 2010). Concernant le Cd, bien que dans cette étude, en moyenne plus de la moitié du Cd se trouve dans la F4, sa distribution est très variable. En ne considérant que les sols pour lesquels la contamination est liée à une source anthropique et non à une potentielle forte anomalie géochimique (*e.g.* FD : France DROM, GR : Grèce et NI : Irlande du Nord), sa distribution a également tendance à être majoritaire dans les fractions F1 et F2 telle qu'observée dans la littérature. Il est possible que pour ces sites, le Cd soit lié à ou inclus dans des composés minéraux le rendant très peu mobile et que pour le Cd des fractions plus mobiles aient été lessivées avec le temps.





F1 : fraction échangeable, hydrosoluble et acido-soluble, F2 : fraction réductible, F3 : fraction oxydable, F4 : fraction résiduelle ; B : Belgique ; MF : France métropolitaine ; FD : France DROM ; GR : Grèce ; et NI : Irlande du Nord

3.1.2.3. La bioaccessibilité orale

Pour le Cd et le Pb, de larges gammes de BAc sont observées et sont comprises entre 1 et 86% (38%) et de 3 à 84% (45%) dans la phase G et entre 1 à 65% (19%) et 0,2 à 15% (6%) dans la phase GI pour le Cd et le Pb respectivement (Figure 15). D'une manière générale, et comme observé classiquement, leur BAc est supérieure dans la phase G par rapport à la phase GI (facteur ~2 et ~7, respectivement). La BAc de l'As est moins élevée en général par rapport au Cd et au Pb avec en moyenne 17% de BAc dans la phase G et 11% dans la phase GI. La BAc du Sb est la plus faible avec en moyenne 3% de BAc dans les deux phases. Leur distribution entre les deux phases est similaire. Souvent, les cas pour lesquels les différences de BAc sont importantes entre les deux phases, correspondent à des sols faiblement contaminés, ce qui augmente les incertitudes analytiques des résultats. La synthèse des pourcentages de bioaccessibilité dans les phases G et GI est présentée dans le Tableau 22.

Ces résultats sont globalement en cohérence pour l'As et le Sb avec les données de la littérature présentées dans le Chapitre 1 (Billmann et al., 2023) dans laquelle la BAc de l'As est inférieure à 30% pour la moitié des études dans les deux phases. La BAc du Sb pour ¾ des études, est inférieure à 40% dans la phase G et inférieure à 30% dans la phase GI. Néanmoins, la BAc du Pb et du Cd dans la littérature est pour la moitié des cas inférieure à 50% et à 60% dans la phase G et inférieure à 30% et 40% dans la phase GI. Ainsi, dans cette étude, les moyennes des pourcentages de BAc dans la phase G du Cd (38%) et du Pb (45%) sont relativement plus faibles, ce qui est lié aux 8 sols sur les 34 de l'étude en provenance de la Réunion, de Nouvelle-Calédonie, de Grèce et d'Irlande du Nord (FD1-4, GR1-1, NI1-2) pour lesquels les concentrations en Pb et Cd résultent probablement d'un fond géochimique.

La distribution dans les phases porteuses n'explique pas suffisamment la BAc du Sb car les pourcentages de Sb présents dans des fractions plus ou moins mobiles (F1, F2, F3) ne sont pas en accord avec les pourcentages de BAc observés. Pour l'As, le Cd et le Pb, la distribution dans les phases porteuses permet à quelques exceptions d'expliquer leur BAc. En effet, la BAc de l'As et du Cd est cohérente avec leur présence dans les fractions F1 et F2 et la BAc du Pb semble pouvoir s'expliquer par sa présence dans la F2. Parmi les exceptions, le sol MF 17 par exemple, 55% de l'As et du Sb, 75% du Cd et la quasi-totalité du Pb se trouvent dans la fraction résiduelle (F4), alors que la BAc du l'As est de 55%, celle du Sb de 23%, celle du Cd de 70% et celle du Pb de 65% dans la phase G. Une hypothèse serait que cela soit lié à la minéralogie des sols ainsi qu'au manque de sélectivité pour certaines phases acido-solubles pour lesquelles la solution d'extraction F1 composée d'acide acétique ne suffit pas à dissoudre les phases minérales tandis que les solutions d'extraction du test UBM ou du test HCl permettent de les dissoudre.



Figure 15. Bioaccessibilité de l'As, du Cd, du Pb et de Sb mesurée par le test UBM dans les phases gastrique (G) et gastro-intestinale (GI) (exprimé en % de la concentration totale) par rapport aux concentrations totales (exprimées en mg kg⁻¹) B : Belgique ; MF : France métropolitaine ; FD : France DROM ; GR : Grèce ; et NI : Irlande du Nord

Tableau 22. Synthèse de la distribution des pourcentages extraits (valeurs moyennes, minimales et maximales exprimées en % par rapport aux concentrations totales) dans les fractions de l'extraction séquentielle (F1, F2, F3 et F4) et de BAc d'As, Cd, Pb et Sb

%		As		Cd				Pb		Sb			
	Moy	Min	Max	Моу	Min	Max	Moy	Min	Max	Moy	Min	Max	
F1	3	0,1	12	12	1,0	66	1	0,1	7	12	1,2	33	
F2	10	0,4	29	19	0,9	52	50	0,1	90	14	1,8	33	
F3	15	0,8	43	5	0,8	11	14	1	73	10	1,5	25	
F4	72	27	99	64	1,0	97	35	4,2	98	64	24	96	
G	17	1,2	79	38	0,9	86	45	3,1	84	3	0,1	24	
GI	11	0,3	37	19	1,0	65	6	0,2	15	3	0,1	10	

3.1.2.4. Prédiction de la bioaccessibilité au moyen du test simplifié HCl

Le test HCl permet de prédire la bioaccessibilité de l'As, du Cd et du Pb obtenue par le test UBM et l'étude de Pelfrêne et al., (2020) a permis l'élaboration d'équations (cf. Tableau 14 dans le Chapitre 2). Ces équations ont été établies sur des sols français (n = 208) présentant une diversité en termes de degrés de contamination et de paramètres physico-chimiques. La Figure 16 présente les relations entre la BAc prédite au moyen des concentrations extraites à l'HCl intégrées dans les équations pour l'As, le Cd et le Pb et leur BAc mesurée au moyen du test UBM dans les deux phases (G et Gl). Pour Sb, il n'existe pas encore d'équation permettant de prédire la BAc du test UBM, ainsi la Figure 17 présente directement la relation entre la concentration de Sb extraite par le test HCl et sa BAc (UBM) mesurée dans les deux phases.

Les prédictions de la BAc du Cd et du Pb sont très bonnes pour les phases G et GI. Pour As, les prédictions de la bioaccessibilité sont un peu moins bonnes, en particulier dans la phase GI pour laquelle la pente suit le moins une relation 1 : 1. Les relations entre les concentrations de Sb extraites par le test HCl et celles extraites par le test UBM dans les phases G et GI sont bonnes avec des coefficients de détermination de 0,86 et 0,89 respectivement dans les deux phases.

Ces résultats sont encourageants car ils renforcent d'une part la validité des équations pour prédire la bioaccessibilité mesurée par le test UBM pour l'As, le Cd et le Pb sur des sols en provenance d'Europe, de contextes différents de ceux ayant servis à l'établissement des équations. D'autre part, tout comme pour le Cr et le Ni, ils montrent leur potentiel pour une éventuelle future utilisation du test simplifié HCl dans le but de prédire la bioaccessibilité du Sb.



Figure 16. Relation entre la bioaccessibilité de l'As, du Cd et du Pb mesurée par le test UBM et celle prédite par le test simplifié HCl dans les phases gastrique (G) et gastro-intestinale (GI)



Figure 17. Relation entre la concentration de Sb mesurée par le test UBM et celle extraite par le test simplifié HCl dans les phases gastrique (G) et gastro-intestinale (GI)

3.1.3. Bilan

Cette étude a porté sur la bioaccessibilité du Cr, du Ni et d'autres EM tels que l'As, le Cd, le Pb et le Sb dans des sols multi-contaminés. Les résultats montrent que le Cr, le Ni et le Sb sont généralement faiblement bioaccessibles, tant dans la phase gastrique que gastro-intestinale. Pour les sols où le Cr et le Ni sont d'origine géogène, la bioaccessibilité reste faible, avec des moyennes de 1,7 % et 4 % dans la phase G, et de 0,6 % et 3 % dans la phase GI, respectivement. En revanche, dans les sols présentant une contamination d'origine anthropique, la bioaccessibilité est plus variable, avec des moyennes de 13 % et 23 % dans la phase G, et de 1 % et 17 % dans la phase GI pour le Cr et le Ni, respectivement. Ces variations soulignent l'impact de l'origine de la contamination sur la bioaccessibilité de ces EM. L'étude montre également que la bioaccessibilité est bien multifactorielle et que la distribution des éléments au sein des phases porteuses explique mieux la bioaccessibilité que les paramètres physicochimiques des sols. Mais l'extraction séquentielle connait des limites liées à la sélectivité des phases, induisant que dans certains cas elle ne permet pas d'expliquer la bioaccessibilité. L'étude de la minéralogie en complément permet une meilleure compréhension pour pallier certaines limites de l'extraction séquentielle. Par ailleurs, le test simplifié HCl s'est révélé prometteur en tant qu'outil prédictif pour la bioaccessibilité du Cr, du Ni et du Sb, notamment dans la phase G, en raison des R² > 0,8 observées avec les données de bioaccessibilité du test UBM. Ce nouveau lot d'échantillons est également venu renforcer les équations établies par Pelfrêne et al., (2020) en montrant de très bonnes prédictions de la BAc pour l'As, le Cd et le Pb, en particulier pour la phase G. Si le test UBM est validé par un modèle in vivo pour le Cr et le Ni, l'utilisation de leurs bioaccessibilités respectives pourrait permettre d'affiner de manière significative l'évaluation des expositions humaines et des risques associés à ces éléments métalliques dans les sols contaminés.

Partie 2 : Etude de l'aspect temporel avec et sans apport d'amendements sur des sols multi-contaminés

L'étude de la bioaccessibilité du Cr et du Ni dans des sols multi-contaminés a permis d'observer que leur bioaccessibilité était généralement inférieure à 20% et 30% dans les deux phases, indiquant l'intérêt de mesurer ce paramètre dans le cadre d'une estimation plus réaliste des expositions humaines par ingestion non intentionnelle de sol et des risques associés. Il a été identifié dans l'état de l'art ainsi que dans cette étude, que l'influence de la matrice du sol sur la bioaccessibilité était complexe car elle résulte d'une multitude d'interactions entre les constituants du sol et les EM. L'environnement dans lequel les contaminants persistent est soumis à des variations dues à la saisonnalité, aux changements climatiques ainsi qu'aux activités humaines telle que l'apport d'amendements (comme par exemple du compost ou du bioachar) dans le but de réduire la mobilité des EM. Se pose donc la question de l'évolution de leur bioaccessibilité au cours du temps avec ou sans apport d'amendements.

3.2. Influence du vieillissement avec ou sans apport d'amendements sur la bioaccessibilité du Cr et du Ni dans des sols multi-contaminés

Une expérimentation de vieillissement accéléré avec ou sans apport d'amendements (biochar ou compost) a été réalisée et les résultats obtenus sont présentés sous forme d'un article scientifique, intitulé « Influence of soil aging on oral bioaccessibility of Cr, Ni and other PTEs in multicontaminated soils with or without amendments », soumis dans le journal Environmental Science and Pollution Research. Cette étude a été réalisée sur cinq sols sélectionnés à la suite de l'étude précédente et a comment objectif d'étudier l'influence que peuvent avoir le vieillissement seul ou combiné à l'apport d'amendements sur la bioaccessibilité du Cr, du Ni tout en considérant également les autres EM étudiés. Pour cela, les sols, ont été amendés ou non de biochar ou de compost avant d'être soumis un vieillissement accéléré en laboratoire permettant de simuler trois années. En complément, une étude de la distribution dans les phases porteuses, mesurée au moyen d'une extraction séquentielle (BCR), ainsi que de la minéralogie, mesurée au moyen d'analyses par DRX, a été réalisée dans le but de mieux comprendre leur bioaccessibilité.

Influence of soil aging on oral bioaccessibility of Cr, Ni, and other PTEs in multicontaminated soils with or without amendments

Madeleine Billmann^{1,2}, Aurélie Pelfrêne¹, Marilyne Soubrand³, Emmanuel Joussein³, Corinne Hulot⁴, Arnaud Papin⁴, Benjamin Pauget⁵

¹Univ. Lille, IMT Nord Europe, Univ. Artois, JUNIA, ULR 4515 - LGCgE, Laboratoire de Génie Civil et géo-Environnement, 48 boulevard Vauban, F-59000 Lille, France

²Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie, 20 avenue du Grésillé BP 90406, F-49004 Angers Cedex 01, France

³Université de Limoges, E2LIM UR 24133, 123 avenue Albert Thomas, 87060 Limoges cedex, France
 ⁴Ineris, Parc technologique Alata, BP 2, F-60550 Verneuil-en-Halatte, France
 ⁵Tesora, 41, rue du Périer 92120, Montrouge, France

Abstract

Understanding the long-term behavior of potentially toxic elements (PTEs) in soils is crucial for effective environmental management, particularly given that soil conditions are continually affected by seasonal changes and are likely to be further altered by climate change. Although soil amendments, such as biochar and compost, are frequently used to immobilize PTEs, their long-term effects on the bioaccessibility (BAc) of these elements remain inadequately explored, particularly for less-studied PTEs, such as Cr and Ni, despite the significant risks they pose. This study examined the effects of accelerated soil aging on the BAc of Cr, Ni, and other PTEs in multi-contaminated soils, with and without the addition of biochar or compost.

Five multi-contaminated soils were selected based on their Cr, Cr (VI), and Ni contents. These soils underwent a 3-week accelerated aging process designed to replicate 3 years of natural ageing. The experimental protocol involved subjecting soils to freezing, thawing, and heating cycles to mimic the seasonal changes and extreme weather conditions associated with climate change.

The results indicated that soil aging alone reduced the BAc of Cr and Ni, although the patterns were inconsistent. The addition of biochar or compost also produced variable results, with compost generally having a more pronounced effect on reducing BAc. The speciation of Cr (VI) mirrored the BAc trends of Cr in the gastric phase, exhibiting varying responses to soil aging and soil amendment, suggesting a link between these factors. For the other PTEs, BAc was highly site-specific, with biochar generally proving less effective in reducing BAc than compost.

The observed trends in BAc were linked to the presence of PTEs in the mineral phases that dissolved under the acidic conditions of the gastric phase. In contrast, a lower BAc in the intestinal phase was associated with mineral reprecipitation and more favorable absorption conditions provided by a nearneutral pH. Although sequential extraction and X-ray diffraction analyses provided valuable insights into these mechanisms, they were not always sufficient to fully explain the observed patterns in BAc.

Keywords

Contaminated soil; Soil aging; Biochar; Compost; Bioaccessibility; Geochemical behavior; Solid speciation

3.2.1. Introduction

The environmental conditions under which potentially toxic elements (PTEs) persist in soils change over time due to seasonality and yearly variations. As the world faces a growing issue of soil contamination by PTEs from various anthropogenic sources, including mining, industrial activities, and agricultural practices (Blais et al., 2008), understanding their long-term behavior is crucial for developing robust and sustainable soil remediation strategies for effective environmental management. The proximity of contaminated areas to urban and residential zones is of particular concern as it increases the potential for human exposure through direct ingestion of soil particles. Exposure to PTEs can have various health effects. For example, Cr and Ni can cause headaches, nausea, vomiting, diarrhea, skin irritation, respiratory and liver diseases, renal failure, reproductive toxicity, and carcinogenic risks (Ayangbenro et al., 2017). Other PTEs, such as Pb, As, Cd, and Sb, are also widely recognized as hazardous because of their potential to cause neurological damage, cancer, bone diseases, and various systemic effects (Wang et al., 2023; Gron & Andersen, 2003). To assess exposure and risk more realistically, it is essential to consider the bioavailable fraction (i.e., the fraction that reaches the systemic circulation; Semple et al., 2004) of PTEs instead of their total concentration. However, measuring the bioavailability is laborious because it requires in vivo experimentation. To address this, in vitro bioaccessibility (BAc) tests are invaluable tools for predicting bioavailability by mimicking the solubilization phase using synthetic digestive fluids (e.g., PBET, Ruby et al., 1996; Method 1340, US EPA, 2017; SBET, Medlin, 1997; DIN, Hack et al., 2002; UBM; Denys et al., 2012; ISO 17924, 2019). To date, most BAc studies have focused on As and Pb and, to a lesser extent, on Cd, as these are the most problematic PTEs worldwide. However, an increasing number of studies are investigating lesser-studied elements, such as Cr, Ni, and Sb, because contaminated sites are generally multi-contaminated, and the risk to humans is the cumulative effect of all exposures.

More specifically, the literature shows that the BAc of Cr and Ni may naturally decrease over time, which is linked to changes in the metal distribution within the carrier phases, as assessed by sequential chemical extractions. For instance, Zapusek and Lestan (2009) demonstrated that the Ni BAc decreases after aging in the gastrointestinal (GI) phase, which is consistent with an increase in Ni bound to the residual fraction. Fendorf et al., (2004) found that the BAc of Cr in spiked soils decreased from approximately 60 to 25 mg kg⁻¹ within 14 days, attributed to a decrease in the exchangeable fraction, which corresponds to Cr bound to carbonates, indicating a shift from outer- to inner-sphere complexes. Stewart et al., (2003) showed that the Cr BAc decreased over time for Cr (III) and Cr (VI); the reduction was more pronounced and occurred faster (within 50 days) for Cr (III) because of the formation of Cr (OH)₃, which was not easily dissolved during the acidic stage of the BAc test. Because Cr (VI) is mobile and toxic, reducing its mobility and toxicity involves the reduction of Cr (VI) to Cr (III) (Kumpiene et al., 2018). The predominant shift in the Cr (III)/Cr (VI) equilibrium tends toward the reduction of Cr (VI), which can be favored by the presence of organic matter (OM) and divalent iron (Bulgariu et al., 2008; Stewart et al., 2003). This raises questions about the relevance and long-term effects of changes in practice on the BAc. Among these practices, the addition of amendments, particularly biochar and compost, is commonly used to improve the agronomic properties of soil and reduce the mobility of PTEs, thereby decreasing their release and BAc (Becerra-Agudelo et al., 2022; Huang et al., 2016). Guo et al., (2023) highlighted that the addition of biochar reduced the content of available Ni in soil by 31% after 63 days. The reduction of Cr BAc by biochar is particularly efficient for Cr (VI), as evidenced by Zhang et al., (2017), where the bioaccessible Cr (VI) decreased from 135 to 105 mg kg⁻¹, whereas the total Cr BAc only decreased from 170 to 165 mg kg⁻¹. However, the effects of these amendments are not always beneficial, particularly for multi-contaminated sites, where each contaminant may behave differently depending on its speciation or competition with other compounds (Arabi et al., 2021; Medynska-Juraszek et al., 2020; Xia et al., 2020). Gao et al., (2023) showed that the effect of biochar on Ni availability, measured by CaCl₂ extraction, might also depend on the biochar dose, as the immobilization capacity appeared to diminish with an increase in the dose.

This study aimed to evaluate the effects of aging with or without amendments (biochar and compost) on the BAc of Cr and Ni in five contaminated soils of anthropogenic origin under controlled laboratory conditions. Because natural soil aging occurs over several years, studies have attempted to simulate soil aging by subjecting soils to artificial environmental conditions that mimic the passage of seasons and years. The most frequent conditions to which soils are subjected include frost, wetting, high temperatures, acid leaching, and oxidation (Dagois et al., 2016; Meng et al., 2018; Shen et al., 2018a, b; Yang et al., 2022; Zapusek & Lestan, 2009). Based on literature, we tested a protocol consisting of freeze/thaw phases, high-temperature phases, and a phase at the optimum temperature for microbial

124

growth. Freeze-thaw cycles can influence chemical reactions and compound availability in soils (Marion et al., 1995), but the effects seem to be site-dependent and can be linked to the soil fraction size (Zhao et al., 2019). Microbial activity can induce changes in soil properties (pH and redox state) that influence the solubility and bioavailability of PTEs (Abdy et al., 2016). In our study, soil samples with or without amendments were subjected to an accelerated soil aging experiment, simulating 3 years of drastic environmental conditions representative of those found in northern France and consistent with climate change. The BAc of the PTEs was measured using the Unified BAc Method (UBM) test, and solid-phase speciation was analyzed using BCR sequential extraction and environmental mineralogy using X-ray diffraction (XRD) before and after soil aging to observe any modifications and better understand the BAc mechanisms. This study focused on Cr and Ni; however, because the soils studied were multi-contaminated, other PTEs (As, Cd, Pb, and Sb) were also included as complementary subjects.

3.2.2. Methodology

3.2.2.1. Experimental set-up

Five contaminated soil samples (labeled S1–S5) were collected from various anthropogenically contaminated sites in France. S1, S2, and S3 originate from the northern region of France and are associated with locations near slag heaps, old steel sites, and industrial areas, respectively. S4 was collected from a site adjacent to a chroming industry in southwest France, whereas S5 was collected from an urban wasteland in eastern France. Two commercial products were tested as amendments: biochar (ElemenTerre, Rédéné, France) obtained by the pyrolysis of untreated wood and compost (Agriopale, Cucq, France) obtained from green waste. The main characteristics of the soil and amended samples are presented in Table 23.

Table 23. Soil	and	amendment	characteristics
----------------	-----	-----------	-----------------

	S1	S2	S3	S4	S5	Biochar	Compost
рН	7.9	8.2	7.8	7.7	7.2	9.3	7.6
Pseudototal Cr (mg kg⁻¹)	378	2,902	31	12,175	775	14	4
Cr VI (mg kg ⁻¹)	<0.1	404	2	746	2	-	-
Pseudototal Ni (mg kg⁻¹)	22	41	283	122	281	7	3
Pseudototal As (mg kg ⁻¹)	11	18	5	5	59	3	<0.6
Pseudototal Cd (mg kg⁻¹)	9	1.4	1	0.8	45	<1	<1
Pseudototal Pb (mg kg⁻¹)	66	369	339	3785	43664	2	20
Pseudototal Sb (mg kg ⁻¹)	6	55	2	37	89	<1	<1
Total CaCO₃ (g kg ⁻¹)	34	90	92	1	72	-	-
Organic matter (%)	12	10	1	3	23	-	-
Assimilable P (mg kg ^{−1})	2,383	50	46	<6	94	-	-
Oxides Fe (mg kg⁻¹)	4,926	9,606	5,185	5,908	55,945	-	-
Oxides AI (mg kg⁻¹)	636	378	354	170	1573	-	-
Oxides Mn (mg kg ⁻¹)	18	81	24	61	251	-	-
CEC (cmol ⁺ kg ⁻¹)	43	28	10	18	36	-	-

CaCO₃: carbonate; P: phosphorus; CEC: cation exchange capacity; <X: quantification limit.

The pH values of the soil samples ranged from 7.2 to 8.2, indicating a relatively high alkalinity. The pH of the biochar and compost used as amendments were 9.3 and 7.6, respectively. Pseudototal concentrations of Ni in S1, S2, S3, S4, and S5 were 22, 41, 283, 122, and 281 mg kg⁻¹, whereas for Cr, they were 378, 2,902, 31, 1,2175, and 755 mg kg⁻¹, respectively. S3 and S5 were specifically selected for the study of bioaccessible Ni, S1 and S5 for bioaccessible Cr (III), and S2 and S4 for Cr BAc in soils with significant Cr (VI) concentrations. These soils also contain other PTEs, with pseudototal concentrations of As, Cd, Pb, and Sb ranging from 5 to 59 mg kg⁻¹, 0.8 to 45 mg kg⁻¹, 66 to 43,664 mg kg⁻¹, and 2 to 89 mg kg⁻¹, respectively. Total calcium carbonates (CaCO₃), OM content, and assimilable phosphorus (P₂O₅) in the five soils ranged from 1 to 92 g kg⁻¹, 1 to 23%, and <6 to 2,383 mg kg⁻¹, respectively. Fe, Al, and Mn oxides ranged from 4,926 to 55,945, 170 to 1,573 mg kg⁻¹, and 18 to 251 mg kg⁻¹, respectively. The cation exchange capacity (CEC) ranged from 10 to 45 cmol⁺ kg⁻¹.

To assess the effects of aging conditions, with or without amendments, on Cr and Ni BAc (and to a lesser extent, other PTEs), 50 g of each contaminated soil, with the addition of 5% biochar or compost, or no amendment, were placed in polypropylene cups measuring 5×5×6 cm. Each treatment was performed in triplicate. Before starting the aging process, the soils were moistened to field capacity (100%), amendments were added and carefully mixed, and the mixtures were left to stand for 3 days to allow equilibria to form between the contaminants and the solid matrix. The soil-aging protocol was performed over 3 weeks, with each week simulating 1 year. Each simulated year comprised three freeze–thaw phases over the first 3 days. Specifically, soils were frozen at -20 °C for 6 h and thawed at 20 °C for 18 h. For the next 2 days, soils were subjected to two high-temperature phases, where they were incubated at 38 °C for 6 h and then cooled to 20 °C for 18 h. Finally, soils were incubated at 28 °C for 48 h, which corresponds to the optimum temperature for microbiological development (Dagois et al., 2016). After each phase, a mixture of 4/5 deionized and 1/5 tap water to increase the slightly to low pH of deionized water, was added to restore the water content to field capacity (100%). The soils were sampled and analyzed before soil aging (T0) and after three cycles of soil aging (T3).

3.2.2.1. Analysis

Pseudototal concentrations and pH values

The pseudototal concentrations of PTEs were determined using the NF 13657 method. Unamended soil (0.4 g), dried and sieved to 250 μ m, was mineralized with aqua regia (6 mL HCl and 2 mL HNO₃) in a closed microwave oven. The pseudototal concentrations were analyzed using ICP optical emission spectrometry (ICP-OES, Agilent, CA, USA). Soil pH was measured before (T0) and after (T3) soil aging
under controlled laboratory conditions. This was done under control (unamended) and biochar- or compost-amended conditions, using a mixture (1:5, v/v) of 2 mm sieved soil matrix and water.

Solid phase distribution

The solid-phase distributions of Cr, Ni, As, Cd, Pb, and Sb in the five studied soils were assessed using a sequential extraction procedure recommended by the Standard Measurement and Testing Program (SM&T) of the European Community, formerly known as BCR (Rauret et al., 2000). The protocol extracts four fractions: F1: Exchangeable, water- and acid-soluble (0.11 mol L⁻¹ acetic acid); F2: Reducible (0.5 mol L⁻¹ hydroxylammonium chloride); F3: Oxidizable (8.8 mol L⁻¹ H₂O₂, followed by 1.0 mol L⁻¹ ammonium acetate at pH 2); F4: Residual (aqua regia). Each sample suspension was agitated using a rotary shaker for 16 h to facilitate extraction. BCR CRM 701 was used as the standard reference material throughout the extraction process. The total recovery of the extraction steps for the reference material ranged between 94 and 109% of the pseudo-total concentrations of all PTEs combined.

In vitro BAc of Cr, Ni and other PTEs

The Unified BAc Method (ISO 17924; Denys et al., 2012) was employed to assess the Cr, Ni, BAc, and other PTEs in the five soil samples, with and without amendments, before (T0) and after soil aging (T3). The experiment involved simulating the gastric (G) and GI phases of digestion using synthetic digestive fluids that mimicked the composition of human digestive fluids. Measurements were conducted in triplicate for each sample in each phase. The protocol consisted of adding 9 mL of saliva to 0.6 g of dried soil (sieved to <250 mm particle size). Then, 13.5 mL of the gastric solution was added and the pH was adjusted to 1.20 ± 0.05 using HCl (37%). The mixture was then shaken at 37 °C for 1 h. The G phase was obtained by centrifuging the suspension at $3,000 \times g$ for 5 min. In the other solutions, 27 mL of duodenal solution and 9 mL of bile solution were added to simulate the GI phase. The pH was adjusted to 6.3 ± 0.5 with NaOH (10 M). The suspension was then homogenized at 37 °C for 4 h. After centrifugation, the resulting supernatant was acidified and analyzed using ICP-OES or mass spectrometry to determine the bioaccessible concentrations of PTEs in the G and GI phases. The bioaccessible concentrations of PTEs were expressed in mg kg⁻¹ and as a percentage of the pseudototal concentrations. Quality control measures included blank samples and the use of the NRC-CRNC-PACS-3 reference material to ensure accuracy and reliability of the results. Compared with the BAc data determined internally for this reference material, the recovery of BAc was between 85 and 115% for the PTEs in this study.

Chemical speciation of Cr

The NF ISO 15192 method was used to assess Cr speciation in the soil samples. Specifically, Cr (VI) was extracted by alkaline digestion of the soil samples. After extraction, Cr (VI) was detected by ion chromatography and measured spectrophotometrically at 540 nm following post-column derivatization with 1,5-diphenylcarbazide in an acidic solution. Quality control was implemented according to the instructions outlined in the standard to ensure the reliability and validity of the method. The Cr (III) content of the soil samples was calculated as the difference between the pseudototal Cr and Cr (VI) concentrations. This approach allows the determination of Cr (VI) and Cr (III) speciation in soil samples, providing insights into their environmental behavior and potential toxicity.

Mineralogy

XRD has facilitated the semi-qualitative and semi-quantitative characterization of crystalline mineralogical phases if they represent at least 5% of the sample. Mineralogical analyses of the <2 μ m ground fraction were conducted using XD8 Advance BRUKER AXS diffractometers (Siemens, Munich, Germany) in $\theta/2\theta$ geometry (where θ denotes the angle of incidence of the X-ray, and the X-ray is diffracted from an angle 2 θ), equipped with a Lynxeye detector. The device utilizes a Cu X-ray tube ($\lambda_{\kappa\alpha} \approx 1.5406$ Å) with a Ni filter. Measurements were conducted under the following experimental conditions: 40 kV and 40 mA for tube excitation during analysis on a standard fraction sample holder, and 30 kV and 40 mA for analysis on a sample with a fine fraction holder. The instrument settings included a primary slit of 2.5° and divergence slit of 0.6 mm.

3.2.2.3. Statistical analysis

All the data were analyzed using three replicates for each condition. Differences between the unamended (control) and amended (biochar or compost) conditions, and between soils before (T0) and after soil aging (T3), were assessed using Student's t-tests. Statistical analyses were conducted using XLSTAT 2022.1.1 and Microsoft Excel 16.0.16827.

3.2.3. Results and discussion

3.2.3.1. Influence of soil aging with or without amendments on soil pH

Soil pH was measured before and after soil aging under controlled laboratory conditions, with and without the addition of amendments. The results are shown in Figure 18. The aim was to observe the pH variations that could occur: (i) with aging alone, by comparing the soil pH measured at T0 and T3 for the control modality; (ii) with a combination of aging and the addition of biochar or compost, by

comparing the soil pH at TO and T3 for each amended modality; and (iii) with a combination of aging and amendment addition, by comparing the soil pH among the three modalities (control, biochar, and compost) at TO and T3.

Soil aging in the control modalities increased the soil pH for S3, S4, and S5 by 0.2, 0.3, and 0.4 pH units, respectively. No changes in soil pH were observed in S1 or S2. The combination of soil aging and biochar addition increased soil pH for S4 and S5 by 0.3 and 0.2 pH units, respectively. No changes in soil pH were observed in S1, S2, and S3. With compost addition, pH values increased for S2, S3, S4, and S5 by 0.2–0.3 pH units. No changes in soil pH were observed at S1. Comparison of control modalities with amended modalities (biochar or compost) at T0 showed that the addition of amendments immediately increased soil pH compared to controls for all soils in the case of biochar, and for S1, S4, and S5 in the case of compost addition. Only one slight decrease was observed for S2 with compost amendment compared with the control soil. Comparing control modalities and amended modalities at T3 showed that biochar-amended soils had higher pH than control soils for all samples, with increases ranging from 0.1 to 0.4 pH units. In the case of compost addition, this increase in pH was observed only in S1 and S5, with increases of 0.1 and 0.2 pH units, respectively.



Figure 18. Soil pH in the five contaminated soils (S1, S2, S3, S4, and S5) at T0 and T3 without (Control) and with amendments (Biochar or Compost)

* indicates a statistical significance between T0 and T3 for one modality; a, b, c indicates a statistical significance between modalities at T0 and A, B, C between modalities at T3

Soil aging alone induced a slight pH increase in S3, S4, and S5. This increase may be due to the degradation of organic compounds, particularly for S5, which contained 23% of OM. Indeed, high temperatures and irrigation, as found in our aging protocol, favor OM decomposition (McCauley et al., 2009). S3 and S4 had lower CEC, indicating that their capacity to resist pH variation, such as the addition of high-pH amendments, might be more limited than that of the other soils. For these soils, the same trend was observed for the amendment modalities, indicating that an increase in pH might be solely related to aging. The increase in soil pH observed when comparing the control and amended

treatments at T0 and T3 can be explained by the addition of high-pH biochar (9.3) and moderately high-pH compost (7.6). The same was observed by Medynska-Juraszek et al., (2020), where the addition of 5% biochar or compost increased soil pH by 0.58 and 0.78 units, respectively, after 8 weeks of incubation. In contrast, the slightly lower pH observed for S2 in the compost modalities at T0 compared to the control soil can be explained by the 0.6 pH units being higher for S2 compared to the compost. However, for S2, the compost modality was the only one for which an increase in pH was observed due to aging, nullifying the initial reduction in T3. This might be linked to the degradation of OM in the compost, which could be responsible for the lower pH in T0 and the higher pH in T3. Soil pH is an important parameter that provides information regarding the charge of compounds and the possibility of identifying compounds that are sensitive to acidity, such as carbonates.

3.2.3.1. Influence of soil aging with or without amendments on BAc of PTEs

Nickel

Similar to the soil pH, the BAc of Ni was measured in the G and GI phases before and after soil aging, with and without the addition of biochar or compost, specifically for S3 and S5 (Figure 19). The results for the other soils with low concentrations are shown in the Supplementary Material (SM2). The aim was to investigate the BAc variations that can occur (i) with aging alone by comparing the BAc measured for the control modality at T0 and T3, (ii) with a combination of aging and the addition of biochar or compost by comparing the BAc at T0 and T3 for each amended modality, and (iii) with a combination of aging and amendment addition by comparing at T0 and then at T3 the soil BAc in the control, biochar, and compost modalities.

For S3, when comparing the BAc at T0 and T3, aging alone induced no significant change in the control modalities or in the modalities with combined soil aging and biochar or compost addition. Comparing T0 modalities, the addition of compost slightly reduced the Ni BAc in the GI phase from 65 to 58 mg kg⁻¹. Comparing control modalities and amended modalities after soil aging (T3) showed that Ni BAc in compost-amended soils slightly dropped from 68 to 54 mg kg⁻¹. Soil aging alone was not sufficient to induce a modification in Ni BAc in either phase, although slight soil pH modifications occurred. The addition of compost enhanced the immobilization of Ni in the GI phase, whereas soil aging alone was not sufficient to reduce it. The OM added to the compost may have formed stable complexes with solubilized Ni in the near-neutral pH GI phase. Indeed, Mellis et al., (2004) showed that the presence of OM allows for better adsorption of Ni and favors maximal adsorption at a lower pH compared to soils without OM. In contrast, the influence of biochar addition was limited. Yang et al., (2022) found that biochar is not always effective in reducing the leachability of Ni.

For S5, soil aging alone in control modalities reduced Ni BAc in the G phase from 178 to 162 mg kg⁻¹. The combination of soil aging and biochar addition slightly reduced Ni BAc in the GI phase from 137 to 125 mg kg⁻¹. The combination of soil aging and compost addition slightly decreased Ni BAc in the G phase from 168 to 158 mg kg⁻¹. Comparing control and amended modalities after soil aging (T3) showed that Ni BAc in the GI phase decreased from 132 to 125 mg kg⁻¹ in biochar-amended soils and to 119 mg kg⁻¹ in compost-amended soils. However, Ni BAc slightly increased in the G phase, from 162 to 168 mg kg⁻¹. For S5, soil aging alone was sufficient to reduce the Ni BAc, which is consistent with the immobilization mechanisms observed over time. Only in the GI phase did the addition of amendments slightly enhance soil aging and Ni immobilization. The environment in the GI phase could be more favorable for Ni immobilization in the presence of biochar or compost.



Figure 19. Bioaccessible Ni concentrations (mg kg⁻¹) in S3 and S3 before (T0) and after (T3) soil aging and without (Control) and with amendments (Biochar/Compost)
G: gastric phase; GI: gastrointestinal phase; * indicates a statistical significance between T0 and T3; a,b,c indicates a statistical significance between modalities at T0 and A,B,C between modalities at T3 for T test at the level 0.0.

Considering the other soils with low Ni BAc, that is, S1, S2, and S4, the influence of soil aging, with or without amendment, varied. In S1, soil aging alone increased the Ni BAc in the G phase from 8 to 14 mg kg⁻¹ in the control modality. In S2, the Ni BAc did not vary significantly. In S4, the addition of biochar combined with soil aging increased the Ni BAc in both phases, whereas soil aging alone had no effect. Although Ni was present in the mobile phase, neither aging nor the addition of biochar appeared to reduce its BAc. Only the addition of compost slightly reduced BAc.

Chromium

The BAc of Cr was measured in the G and GI phases before and after soil aging with and without the addition of biochar or compost (Figure 20). S3 is present in the SM2 because BAc and pseudototal Cr are low. The Cr (VI) concentration is shown in Figure 21. Similar to Ni, variations in the Cr BAc were observed with aging alone, with a combination of aging and the addition of biochar or compost, and with a combination of aging and amendment addition. Additionally, the relationship between the Cr

BAc and Cr (VI) speciation was studied in Cr (VI)-contaminated soils (S2 and S4). This analysis provides insight into the influence of different soil treatments and aging processes on the BAc and speciation of Cr.

For S1, soil aging alone did not induce any changes in Cr BAc in the control or amended treatments. The addition of compost slightly reduced Cr BAc at T0 compared to the control modality, where it slightly dropped from 311 to 295 mg kg⁻¹. A similar decrease was observed with soil aging in combination with compost addition, where Cr BAc decreased slightly from 306 to 286 mg kg⁻¹ compared to the control. S1 appeared to be less responsive to aging or the addition of compost or biochar. Moreover, 82% of Cr is bioaccessible in the G phase, which is markedly higher than the BAc generally observed (Billmann et al., 2024; Bourliva et al., 2021; Brodaway et al., 2010; Fernandez-Caliani et al., 2019; Fernandez-Caliani et al., 2020; Gaberšek & Gosar, 2024; Mehta et al., 2019; Mehta et al., 2014; Qin et al., 2011; Wragg et al., 2017). Perhaps this high BAc in the G phase is linked to the high P₂O₅ concentration; as Cr analogs to P, they might compete for binding sites (Serrano et al., 2024). However, the reduction in Cr BAc with soil aging in combination with compost addition was encouraging, suggesting that the immobilizing effects of compost may become more pronounced over a longer period.



Figure 20. Bioaccessible Cr concentrations (mg kg⁻¹) in S1, S2, S4, and S5 before (T0) and after (T3) soil aging and without (Control) and with amendments (Biochar/Compost). G: gastric phase; GI: gastrointestinal phase

* indicates a statistical significance between TO and T3; a,b,c indicates a statistical significance between modalities at T0 and A,B,C between modalities at T3 for T test at the level 0.05



Figure 21. Cr (VI) concentrations (mg kg⁻¹) in S2 and S4 before (T0) and after (T3) soil aging and without (Control) and with amendments (Biochar/Compost)

For S2, soil aging in control modalities increased Cr BAc in the G phase, rising from 177 to 209 mg kg⁻¹, but decreased slightly it in the GI phase, from 66 to 43 mg kg⁻¹. Soil aging in biochar-amended modalities reduced slightly Cr BAc in both phases: from 172 to 166 and 78 to 55 mg kg⁻¹ in the G and GI phases, respectively. A comparison of the control and amended treatments after soil aging (T3) showed that the Cr BAc in the G phase decreased from 209 to 166 in biochar- and compost-amended soils. However, in the GI phase, Cr BAc increased in the biochar modality, from 43 to 55 mg kg⁻¹. Moreover, soil aging alone induced an increase of 68 mg kg⁻¹ Cr (VI) when comparing T0 and T3. Conversely, the addition of biochar and compost slightly reduced the Cr (VI) concentration by 39 and 63 mg kg⁻¹, respectively. For S2, soil aging alone increased Cr BAc in the G phase, whereas the addition of amendments mitigated the time-related mobilization of Cr. The evolution of Cr (VI) speciation mirrored that of Cr BAc in the G phase, suggesting a link and highlighting the benefits of these amendments. This oxidation may be related to the presence of Mn oxides (Table 1), as they are known to oxidize Cr (III) to Cr (VI) (Liang et al., 2021). In contrast, during the GI phase, soil aging alone was sufficient to reduce Cr BAc, and the addition of amendments had minimal effect. However, compost seemed to slightly mitigate the reduction in Cr BAc due to soil aging in T3 compared with the unamended or biochar treatments.

For S4, soil aging in control modalities reduced Cr BAc in the G phase, dropping from 362 to 258 mg kg⁻¹. In biochar-amended modalities combined with aging, Cr BAc in the G phase increased from 285 to 350 mg kg⁻¹. In compost-amended modalities, soil aging increased Cr BAc from 236 to 291 mg kg⁻¹ in the G phase and decreased it from 112 to 62 mg kg⁻¹ in the GI phase. Comparing the control modality to biochar and compost modalities before soil aging (T0), Cr BAc in the G phase immediately decreased from 362 to 285 and 236 mg kg⁻¹, respectively. Conversely, in the GI phase, the addition of compost increased Cr BAc from 85 to 112 mg kg⁻¹. Comparing control- and biochar-amended modalities after soil aging (T3) showed that Cr BAc increased from 258 to 350 mg kg⁻¹. For compost modalities, Cr BAc in the GI phase dropped from 104 to 62 mg kg⁻¹. When comparing Cr (VI) in the control modality at T0 and T3, soil aging alone reduced Cr (VI) by 430 mg kg⁻¹. Although less effective, biochar and compost, in combination with soil aging, also reduced Cr (VI) concentrations by 146 and

114 mg kg⁻¹, respectively. Soil aging alone reduced Cr BAc in the G phase; however, the opposite was observed with the addition of amendments. The addition of soil improvers appeared to be counterproductive during this phase. Again, Cr BAc in the G phase and Cr (VI) speciation showed similar trends, suggesting that they are related, which is consistent with the findings of Steward et al., (2003). However, in the GI phase, the compost seemed to have a slightly lower Cr BAc than the control. The evolution of BAc varies depending on the phase considered, emphasizing the need to determine which phase (G or GI) reflects the most realistic conditions through *in vivo* experiments.

For S5, soil aging in control modalities decreased Cr BAc in the G phase from 186 to 142 mg kg⁻¹. Soil aging combined with biochar or compost addition further reduced Cr BAc to 152 and 131 mg kg⁻¹, respectively. Comparing the control modality with the compost modality before soil aging (T0), Cr BAc slightly decreased from 186 to 182 mg kg⁻¹. After soil aging (T3), the addition of compost along with aging decreased Cr BAc slightly from 142 to 131 mg kg⁻¹ compared to the control modality. Soil aging alone reduced Cr BAc in S5, with the addition of amendments having a minimal effect. Compost alone slightly reduced Cr BAc compared with the control modality.

Considering S3, which has low Cr BAc (data available in the SM2), soil aging alone combined with compost reduced its BAc in the GI phase from 1.4 to 0.8 mg kg⁻¹. However, the overall effect on Cr BAc was minimal.

3.2.3.3. Other PTEs

The BAc values of the other PTEs are listed in SM2. The BAc values of Pb and Cd were similar, with BAc in the GI phase being consistently low and varying minimally, which is consistent with the results of a previous review (Billmann et al., 2023). Hence, the results for the G phase are presented for these types of PTEs. In S1, in the G phase, soil aging alone increased their BAc from 5.2 to 9.2 mg kg⁻¹ for Cd and from 36 to 53 mg kg⁻¹ for Pb. A similar pattern was observed in the amended modalities. The addition of biochar or compost did not influence BAc compared with the control treatment at T0 or T3.

In S2, Cd BAc showed little variation with soil aging or amendment. However, Pb BAc increased from 147 to 163 mg kg⁻¹ with soil aging alone. A similar increase was observed for compost-amended modalities, where Pb BAc increased from 123 to 144 mg kg⁻¹. Only the addition of biochar mitigated the increase in Pb BAc related to soil aging. Pb BAc showed a pattern similar to that of Cr, suggesting that similar binding or release mechanisms may be involved.

In S3, soil aging, alone or in combination with biochar or compost, did not significantly influence the BAc of Cd or Pb. However, soil aging combined with compost tended to reduce their BAc, decreasing from 0.54 to 0.44 mg kg⁻¹ for Cd and from 159 and 122 mg kg⁻¹ for Pb between T0 control modality and T3 compost modality, respectively.

In S4, soil aging alone reduced the BAc in the G phase from 0.3 to 0.2 mg kg⁻¹ for Cd and from 1478 to 1048 mg kg⁻¹ for Pb. However, the addition of biochar or compost in combination with soil aging increased BAc. For instance, when comparing T0 to T3 in compost-amended modalities, the BAc increased from 0.2 to 0.3 mg kg⁻¹ for Cd and from 1018 to 1182 mg kg⁻¹ for Pb. In the GI phase, the Pb levels decreased with age, and this reduction in BAc was even more pronounced with the addition of amendments. For example, comparing the control modality at T0 with the compost modality at T3 in the GI phase, the BAc decreased from 254 to 91 mg kg⁻¹.

In S5, in the G phase, Cd BAc slightly increased with soil aging in the control and biochar treatments, whereas it decreased in the compost-amended treatment. However, in the GI phase, soil aging increased the Cd BAc for all modalities. For instance, in control soils, Cd BAc increased from 20 to 32 mg kg⁻¹. Regarding Pb in the G phase, soil aging alone, or with the addition of biochar or compost, decreased the Pb BAc. In the control modality, Pb BAc reduced from 30,593 to 26,933 mg kg⁻¹. This reduction was even more pronounced with the addition of compost, as Pb BAc dropped to 25,023 mg kg⁻¹ at T3.

As and Sb exhibited similar behaviors during the aging experiment. In S1, although the BAc was initially low, soil aging increased their concentration in the G phase. For instance, with soil aging alone, As BAc increased from 5 to 9 mg kg⁻¹, and Sb BAc increased from 1.3 to 2.1 mg kg⁻¹. In contrast, in the GI phase, soil aging tended to reduce their BAc, particularly in the biochar-amended modality where As BAc dropped from 4 to 1 mg kg⁻¹, and Sb BAc decreased from 0.8 to 0.3 mg kg⁻¹. In S2, As BAc remained stable regardless of soil aging or amendment addition. Sb BAc was generally low; however, the addition of biochar or compost reduced BAc after soil aging compared to soil aging alone in the G phase. In S3, soil aging tended to increase As BAc in the GI phase, possibly indicating the presence of anionic As species whose binding capacity decreased with increasing environmental pH (Arabi et al., 2015). Conversely, there was little effect of As BAc in the G phase. For example, in the compostamended modality, As BAc in the GI phase increased from 1.3 to 1.6 mg kg⁻¹ after soil aging. Sb BAc was too low to be interpreted for S3. In S4, soil aging alone increased As BAc in both phases and Sb in the GI phase. The addition of biochar or compost did not prevent the increase in As BAc in the GI phase but slightly mitigated it in the G phase. In S5, soil aging alone tended to increase As and Sb BAc in the G phase, with As BAc increasing from 1.2 to 1.5 mg kg⁻¹ and Sb BAc increasing from 3.3 to 4 mg kg⁻¹. The addition of biochar or compost had little effect on the BAc levels.

3.2.3.4. Relationships between oral BAc, mineralogical phases and solid phase distribution

Table 24 presents the semi-quantitative mineralogical characterization performed using XRD, with the potential link between the mineralogical phases identified through XRD analysis and the BCR

sequential extraction fractions. This relationship aids in understanding how different mineralogical phases influence the distribution and speciation of PTEs across the various extraction fractions (F1, F2, F3, and F4) used in the BCR method. As no interpretable differences between the modalities (control, biochar, and compost) or those related to the aging process were observed, only the differences between the initial soils and the residues after the G and GI phase extractions were used to better understand the BAc.

Mineralogical characterization

In S1, the main mineral phases were apatite and calcite, followed by quartz, illite/mica, kaolinite, and traces of hematite. Because apatite is a phosphate mineral, its predominance in this soil is consistent with the high assimilable phosphate measured (2,383 mg kg⁻¹). In S2, the main mineral phase was quartz, followed by calcite, feldspar, chlorite, kaolinite, illite/mica, hematite, and goethite, with traces of Cr oxides and chromite. In S3, the main mineral phase was quartz, followed by calcite, gypsum, and feldspars, with some hematite, goethite, and traces of kaolinite, illite/mica, and smectite. In S4, the main mineral phase was quartz, with minor amounts of feldspar, kaolinite, hematite, goethite, and traces of chromite and Cr oxide. In S5, the main mineral phases were quartz, feldspar, Cr-bearing corundum, illite/mica, and traces of pyrite and hematite.

A mineralogical study of the five soils revealed that the metal-bearing phases are of a different nature according to the soils and elements. The differing stabilities of these bearing phases may affect the geochemical behavior and BAc of the elements under study.

Mineral	Minouel			S1			S2			S3			S4			S5	
category	wineral	BCR fraction	Initial	G	GI												
Ciliantes	Quartz	F4	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Silicates	Feldspars/Plagioclases	F4				+	+	+	++	++	++	+	+	+	++	++	++
	Chlorite	F1		-		+	+	+		-							
Clave	Kaolinite	F1	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	+			(+)	(+)	(+)
Clays	Illite/Micas	F4	++	++	++	+	+	+	(+)	(+)	(+)				+	+	+
	Smectite	F1							(+)								
Carbonates	Calcite	F1	+++	-		++			++	-							
Sulphides	Pyrite	F3/F4													(+)	(+)	(+)
Sulfates	Gypsum	F2/F3							++		(+)						
	Hematite	F2/F4	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)
Oxides	Cr-bearing corundum	F4										+	+	+	++	++	++
	Cr oxide	F2/F4				(+)	(+)	(+)				(+)	(+)	(+)			
Iron oxyhydroxides	Goethite	F2/F4				+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Spinels	Chromite (Cr- and Ni-bearing phases)	F4				(+)	(+)	(+)				(+)	(+)	(+)			
Phosphates	Apatite (Fluorapatite/hydroxyapatite)	F4	+++		++												

Tableau 24. Groups of mineralogical phases in initial soils and residues after UBM extraction in the G and GI phases

(+) Traces: + minor, ++ predominant, +++ major.

Geochemical behavior of PTEs

The solid-phase distributions of Cr, Ni, and other PTEs among different soil fractions - F1 (exchangeable, water-, and acid-soluble), F2 (reducible), F3 (oxidizable), and F4 (residual) - were analyzed in all the samples. The solid-phase distributions of the PTEs are shown in Figure 22. As the addition of amendments had no significant influence on the distribution of PTEs, only the general distribution of the control soils is presented. In the case of Ni, only the results for S3 and S5 are discussed; the other soils are presented in the SM2 because their bioaccessible Ni concentrations were low. In S3, Ni was predominantly bound to reducible compounds, with 50% of the Ni extracted in the F2 fraction, and 24%, 19%, and 7% in the residual, oxidizable, and exchangeable fractions, respectively. For S5, 37%, 30%, 21%, and 12% of Ni was bound to the residual, reducible, exchangeable, and oxidizable fractions, respectively. In the case of Cr, the results for S3 are not discussed because the bioaccessibility of Cr was low. For S1, 90% of the Cr was bound to the residual fraction F4 and 9% to the oxidizable fraction F3, whereas it was absent from the more mobile fractions F1 and F2 (\leq 1%). For S2, 45% of Cr was bound to the F4 fraction, 42% to F3, 13% to F2, and 1% to F1. A similar distribution was observed in S4 and S5, with 51% and 63% of Cr bound to the residual fraction, 35% and 29% to the oxidizable fraction, 13% and 8% to the reducible fraction, and barely present in the exchangeable fraction ($\leq 1\%$).

Cr was mostly bound to residual or oxidizable soil compounds. PTEs tend to form stronger bonds with F3 compounds and are, therefore, more difficult to break, which may explain their low mobility in the environment (Palmer et al., 2014). Unlike Cr, Ni tended to be more widely distributed in various soil phases. A non-negligible fraction is linked to easily mobilizable fractions, such as water- or acid-soluble compounds such as carbonates. Ni tends to be more mobile in the environment than Cr (Cox et al., 2017; Billmann et al., 2024).

Considering other PTEs (Figure 22), As and Sb exhibited similar overall distributions. In S1, 40% of As and 55% of Sb were bound to the residual fraction F4, with the remainder more or less evenly distributed among the other fractions. In S2, 80% of As and 45% of Sb were bound to the residual fraction. Only a small amount of As was detected in the other fractions. For Sb, 45% was found in F3, 10% in F2, and almost none in F1. In S4, the majority of As and Sb was found in F3 with 55% and 65% respectively. In S5, almost all the As and Sb were found in F4. For Pb, almost all the PTE were found in the residual fractions in S1 and F2 for S2 and S4. In S3, Pb was equally distributed between F2 and F4, and was barely present in the other fractions. For S5, approximately 50% of Pb was found in the residual fraction, 15% in F3, and 35% in F2, with Pb being barely present in F1. Regarding Cd in S1, 55% was detected in F4. In S5, Cd was mostly found in F2 (50%), with 35% in F1, and <20% in F3 and F4. The distributions of Cd in S2, S3, and S4 were low.



Figure 22. Solid phase distribution of Cr and Ni in study soils S1 to S5 (expressed in % of pseudototal concentration F1, exchangeable, water-, and acid-soluble fraction; F2, reducible fraction; F3, oxidizable fraction; F4, residual fraction)

Relationships with BAc of PTEs

Sequential extraction techniques are commonly employed to assess the distribution of PTEs in soils, providing insights into their behavior. However, these methods have inherent limitations owing to experimental uncertainties such as variability in the effectiveness of the extractants, and the fact that the mobility of PTEs in soil fractions does not necessarily correlate with their BAc (Cave et al., 2004). Therefore, integrating the results from BCR sequential extraction with soil mineralogical studies can help improve oral BAc (Cox et al., 2017). Analyzing the distribution of PTEs across solid phases of soil, alongside the identification of mineral phases post-UBM extraction, enhances the understanding of the interactions and mechanisms governing PTEs BAc. However, because of the generally low BAc levels, interpretation of the relationship between BAc and BCR extraction and mineralogy is not always feasible.

In S1, the majority of Cr, Cd, and Pb was predominantly found in the F4 fraction, with a high BAC observed in the G phase but significantly lower BAc in the GI phase (Figure 22). The primary mineral phase identified in S1 was fluorapatite, which was categorized as the residual fraction (F4) in the BCR sequential extraction (Table 2). The dissolution of fluorapatite in the G phase likely releases bioaccessible PTEs, thereby explaining the elevated BAc content observed during this phase (Figure 20; Table 24). Notably, although F1 involves an acetic acid solution, its pH is not adjusted, unlike the G phase, which is adjusted to 1.2. Therefore, the F1 extraction primarily solubilizes PTEs bound to calcite and/or linked to clays. The residual fraction underwent mineralization, releasing the remaining PTEs. During the GI phase, fluorapatite reprecipitation was observed, providing sites for the re-binding of PTEs, which likely contributed to the reduced BAc of Cr, Cd, and Pb in this phase. These PTEs exhibited a strong affinity for fluorapatite in S1 soils. Apatite has been recognized as effective for the immobilization of PTEs via surface complexation, substitution, ion exchange, and/or precipitation (Li et al., 2023). Hence, in apatite-rich soils, sequential extraction alone may not fully elucidate BAc, underscoring the importance of integrating mineral phase analysis to better understand these mechanisms. In contrast, Ni, As, and Sb exhibited broader distributions in the solid-phase fractions. Because they were found in F1, their BAc values can be attributed to calcite dissolution. Unlike for Cr, Cd, and Pb, the differences in the extraction yields between the G and GI phases for Ni, As, and Sb were less pronounced. This suggests that these PTEs may have a lower affinity for apatite in S1 soils compared to Cr, Cd, and Pb.

At S2, sequential extractions showed that almost no PTEs were found in the F1 fraction, indicating that bioaccessible PTEs are unlikely to be bound to carbonate minerals, such as calcite, or in the exchangeable form. During UBM extraction, calcite was the only mineral phase that dissolved, suggesting that the PTEs in this soil were not primarily associated with carbonate fractions, except for

Cd. The absence of prominent clay minerals such as smectite, kaolinite, or chlorites in the soil residues further supports this observation. It is probable that the bioaccessible Cr in S2 was in the form of Cr oxides, chromite, iron oxides (hematite), and oxyhydroxides (goethite), which may have undergone partial dissolution in the acidic environment of the G phase. Cox et al., (2017) found low Cr BAc and assumed that they were more likely to originate from weathered olivine and clays and some calcite and apatite than from primary metal oxides, which are highly recalcitrant. Although there was no visible reformation of the mineral phases in the GI phase residue, the BAc of Cr was lower in the GI phase than that in the G phase. This could be due to the close to neutral pH in the GI phase, which may have favored the re-adsorption, precipitation or complexation of Cr and other PTEs (Cd and Pb) with mineral and/or organic phases due to the higher pH (Helser et al., 2022; Gaberšek & Gosar, 2024). In S3, the proportions of As, Cd, and Sb associated with F1 might explain the bioaccessible concentrations of these elements. A mineralogical study of post-UBM extractions highlighted the dissolution of gypsum, calcite, and smectite after gastric extraction. Most of the Ni and Pb, and some of the Cr was found in fraction F2 (reducible fraction), which is associated with Fe and Mn oxides/oxyhydroxides, probably hematite or goethite, in the soil (Table 24). These mineral phases were not dissolved or were only partially dissolved during the *in vitro* extraction process (Table 24) and therefore cannot alone explain the BAc of these PTEs. This study highlights the limitations of sequential extraction and qualitative mineralogy in explaining variations in BAc, particularly in soils where PTEs are mainly associated with minerals that are not dissolved during standard extraction protocols and/or with low total PTE content in the soil. Studying the metal-bearing phases of soil using scanning electron microscopy could help further understand BAc by showing the metal-bearing phases (Gaberšek & Gosar, 2024; Kelepertzis et al., 2021; Mehta et al., 2019; Monneron-Gyurits et al., 2020, 2024).

In S4, the kaolinite present in the initial soil was not observed after the G extraction phase, although this mineral phase typically corresponded to the F1 (acido-soluble) fraction. Almost no Ni, Cd, As, or Sb, and little Pb and Cr were found in F1. Given that PTEs bound to kaolinite are generally exchangeable, it can be inferred that the dissolution of this phase is insufficient to explain their BAc. In this soil, most of the Pb and Ni, and some of the Cr was found in the F2 fraction, which corresponds to the reducible fraction. Fe oxide/oxyhydroxide compounds present in the initial soil, such as hematite and goethite, did not dissolve during *in vitro* digestion (Table 24). The fact that there was no dissolution of the phases in which the PTEs were observed may explain their relatively low percentage BAc. Therefore, semi-quantitative XRD analysis is probably insufficient to explain the BAc of this soil. In S5, there is no evolution of mineralogical phases during *in vitro* digestion according to XRD analysis, highlighting in the case of Cr, the stability of the Cr-bearing phase as Cr-corundum and corresponding to the residual fraction. Indeed, considering sequential extraction, the addition of F1, F2, and F3

fractions corresponded approximately to the bioaccessible concentration. In S5 compared with other soils, several different mineralogical phases were identified. The bioaccessible fraction may bind many different compounds present in quantities that are too small to be properly quantified. As and Sb were almost completely detected in F4, which is consistent with their low BAc.

3.2.4. Conclusion

Soil aging alone was sufficient to reduce Cr and Ni BAc in the G phase. The BAc of Cr and Ni behaved differently in the G phase than in the GI phase, with soil aging having less influence on BAc in the GI phase. However, the addition of biochar or compost seemed to have a greater influence, on Cr and Ni BAc in the GI phase than in the G phase, even if it remained relatively low. The effect of adding biochar in combination with soil aging is more nuanced, as it favors the oxidation of Cr (III) to Cr (VI) in S4, simultaneously increasing Cr BAc in the G phase. Conversely, the opposite trend was observed for S2, suggesting that the evolution of Cr speciation may be specific to each site. Compared to other PTEs, BAc is highly site-specific. Sometimes, soil aging alone was sufficient to reduce Bac; however, the addition of compost appeared to be the most efficient. Indeed, biochar was often less beneficial than compost and sometimes increased BAc.

Sequential extraction and mineralogical analysis using XRD were useful tools for improving the general understanding of the BAc of PTEs in the G and GI phases of the study soils. BAc can often be explained by the presence of PTEs in the mineral phases that dissolve upon contact with the acidic environment in the G phase. Similarly, the lower BAc observed in the GI phase can be explained by the reprecipitation of some mineral phases and the favored absorption conditions induced by the increase in pH close to neutrality in the GI phase. Cr, Pb, and Cd appear to have higher affinities for apatite than Ni, As, and Sb. Although combining these two analytical methods helps to better elucidate certain mechanisms and identify affinities, they are not always sufficient to fully explain the BAc.

Although the results do not perfectly reflect *in situ* conditions, they provide an initial idea of the longterm effects on BAc or Cr speciation, with or without widely used soil amendments. They also help understand the mechanisms driving the BAc. These results provide a basis for further studies on the relevance of using these amendments to reduce the risks to human health, thereby improving our ability to protect the environment and human health.

3.2.5. References

Abdu, N., Abdullahi, A. A., & Abdulkadir, A. (2017). Heavy metals and soil microbes. Environmental Chemistry Letters, 15(1), 65-84. <u>https://doi.org/10.1007/s10311-016-0587-x</u>

Arabi, Z., Rinklebe, J., El-Naggar, A., Hou, D., Sarmah, A. K., & Moreno-Jiménez, E. (2021). (Im)mobilization of arsenic, chromium, and nickel in soils via biochar : A meta-analysis. Environmental Pollution, 286, 117199. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117199

Ayangbenro, A. S., & Babalola, O. O. (2017). A New Strategy for Heavy Metal Polluted Environments : A Review of Microbial Biosorbents. International Journal of Environmental Research and Public Health, 14(1), 94. https://doi.org/10.3390/ijerph14010094

Becerra-Agudelo, E., López, J. E., Betancur-García, H., Carbal-Guerra, J., Torres-Hernández, M., & Saldarriaga, J. F. (2022). Assessment of the application of two amendments (lime and biochar) on the acidification and bioavailability of Ni in a Ni-contaminated agricultural soils of northern Colombia. Heliyon, 8(8), e10221. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10221

Billmann, M., Pelfrêne, A., Hulot, C., Papin, A., & Pauget, B. (2024). Toward a more realistic estimate of exposure to chromium and nickel in soils of geogenic and/or anthropogenic origin : Importance of oral bioaccessibility. Environ Geochem Health.

Blais, J. F., Djedidi, Z., Cheikh, R. B., Tyagi, R. D., & Mercier, G. (2008). Metals Precipitation from Effluents : Review. Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management, 12, 135-149. https://doi.org/10.1061/(ASCE)1090-025X(2008)12:3(135)

Bourliva, A., Aidona, E., Papadopoulou, L., Ferreira da Silva, E., & Patinha, C. (2021). Levels, oral bioaccessibility and health risk of sand-bound potentially harmful elements (PHEs) in public playgrounds : Exploring magnetic properties as a pollution proxy. Environ. Pollut., 290, 118122. <u>https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118122</u>

Broadway, A., Cave, M. R., Wragg, J., Fordyce, F. M., Bewley, R. J. F., Graham, M. C., Ngwenya, B. T., & Farmer, J. G. (2010). Determination of the bioaccessibility of chromium in Glasgow soil and the implications for human health risk assessment. Science of The Total Environment, 267-277. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.09.007

Bulgariu, D., Juravle, D., Bulgariu, L., Macoveanu, M., & Rusu, C. (2008). Distribution and migration of chrome in urban soils—Case study : Iaşi City (industrial zone). Environmental Engineering and Management Journal, 7, 277-288. <u>https://doi.org/10.30638/eemj.2008.031</u>

Cave, M. R., Milodowski, A. E., & Friel, E. N. (2004). Evaluation of a method for identification of host physicochemical phases for trace metals and measurement of their solid-phase partitioning in soil samples by nitric acid extraction and chemometric mixture resolution. Geochemistry: Exploration, Environment, Analysis, 4, 71-86. <u>https://doi.org/10.1144/1467-7873/03-025</u>

Cox, S. F., Rollinson, G., & McKinley, J. M. (2017). Mineralogical characterisation to improve understanding of oral bioaccessibility of Cr and Ni in basaltic soils in Northern Ireland. Journal of Geochemical Exploration, 183, 166-177. <u>https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2017.02.006</u>

Dagois, R., Schwartz, C., Coussy, S., Lorgeoux, C., Ouvrard, S., & Faure, P. (2016). Climatic influence on mobility of organic pollutants in Technosols from contrasted industrial activities. Journal of Soils and Sediments, 16, 1306-1315. <u>https://doi.org/10.1007/s11368-015-1108-4</u>

Denys, S., Caboche, J., Tack, K., Rychen, G., Wragg, J., Cave, M., Jondreville, C., & Feidt, C. (2012). In Vivo Validation of the Unified BARGE Method to Assess the Bioaccessibility of Arsenic, Antimony, Cadmium, and Lead in Soils. Environmental Science & Technology, 46, 6252-6260. <u>https://doi.org/10.1021/es3006942</u>

Fendorf, S., La Force, M. J., & Li, G. (2004). Temporal Changes in Soil Partitioning and Bioaccessibility of Arsenic, Chromium, and Lead. Journal of Environmental Quality, 33, 2049-2055. <u>https://doi.org/10.2134/jeq2004.2049</u>

Fernández-Caliani, J. C., Fernández-Landero, S., & Inmaculada Giráldez, M. (2020). Human bioaccessibility of heavy metals and metalloids naturally occurring at high levels in chestnut grove soils of SW Spain. Proscience, 7, 30-34. <u>https://doi.org/10.14644/ghc2020.005</u>

Fernández-Caliani, J. C., Giraldez, M. I., & Barba-Brioso, C. (2019). Oral bioaccessibility and human health risk assessment of trace elements in agricultural soils impacted by acid mine drainage. 237, 124441. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124441

Gaberšek, M., & Gosar, M. (2024). Oral bioaccessibility of potentially toxic elements in various urban environmental media. Environmental Geochemistry and Health, 46, 259. <u>https://doi.org/10.1007/s10653-024-02073-5</u>

Gao, W., He, W., Zhang, J., Chen, Y., Zhang, Z., Yang, Y., & He, Z. (2023). Effects of biochar-based materials on nickel adsorption and bioavailability in soil. Scientific Reports, 13, 5880. <u>https://doi.org/10.1038/s41598-023-32502-x</u>

Grøn, C., & Andersen, L. (2003). Human Bioaccessibility of Heavy Metals and PAH from Soil; Danish EPA. Technology Programme for Soil and Groundwater Contamination, 840, 113.

Hack, A., Welge, P., Wittsiepe, J., & Wilhelm, M. (2002). Aufnahme und Bilanzierung (Bioverfügbarkeit) ausgewählter Bodenkontaminanten im Tiermodell (Minischwein) (298 73 227/01). Umweltbundesamt.

Helser, J., Vassilieva, E., & Cappuyns, V. (2022). Environmental and human health risk assessment of sulfidic mine waste : Bioaccessibility, leaching and mineralogy. Journal of Hazardous Materials, 424, 127313. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127313

Huang, M., Zhu, Y., Li, Z., Huang, B., Luo, N., Liu, C., & Zeng, G. (2016). Compost as a Soil Amendment to Remediate Heavy Metal-Contaminated Agricultural Soil : Mechanisms, Efficacy, Problems, and Strategies. Water, Air, & Soil Pollution, 227, 359. <u>https://doi.org/10.1007/s11270-016-3068-8</u>

Kelepertzis, E., Chrastný, V., Botsou, F., Sigala, E., Kypritidou, Z., Komárek, M., Skordas, K., & Argyraki, A. (2021). Tracing the sources of bioaccessible metal(loid)s in urban environments : A multidisciplinary approach. Science of The Total Environment, 771, 144827. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144827</u>

Kumpiene, J., Lagerkvist, A., & Maurice, C. (2008). Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments – A review. Waste Management, 28, 215-225. <u>https://doi.org/10.1016/j.wasman.2006.12.012</u>

Li, Z., Qiu, Y., Zhao, D., Li, J., Li, G., Jia, H., Du, D., Dang, Z., Lu, G., Li, X., Yang, C., & Kong, L. (2023). Application of apatite particles for remediation of contaminated soil and groundwater : A review and perspectives. Science of The Total Environment, 904, 166918. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166918</u>

Liang, J., Huang, X., Yan, J., Li, Y., Zhao, Z., Liu, Y., Ye, J., & Wei, Y. (2021). A review of the formation of Cr(VI) via Cr(III) oxidation in soils and groundwater. Science of The Total Environment, 774, 145762. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145762

Marion, G. (1995). Freeze–Thaw Processes and Soil Chemistry.

McCauley, A., Jones, C., & Jacobsen, J. (2009, mai). Soil pH and Organic Matter. Nutrient Management Module.

Medyńska-Juraszek, A., Bednik, M., & Chohura, P. (2020). Assessing the Influence of Compost and Biochar Amendments on the Mobility and Uptake of Heavy Metals by Green Leafy Vegetables. International Journal of Environmental Research and Public Health, 17, 7861. <u>https://doi.org/10.3390/ijerph17217861</u>

Mehta, N., Cipullo, S., Cocerva, T., Coulon, F., Dino, G. A., Ajmone-Marsan, F., Padoan, E., Cox, S. F., Cave, M. R., & De Luca, D. A. (2020). Incorporating oral bioaccessibility into human health risk assessment due to potentially toxic elements in extractive waste and contaminated soils from an abandoned mine site. Chemosphere, 255, 126927. <u>https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126927</u>

Mehta, N., Cocerva, T., Cipullo, S., Padoan, E., Dino, G. A., Ajmone-Marsan, F., Cox, S. F., Coulon, F., & De Luca, D. A. (2019). Linking oral bioaccessibility and solid phase distribution of potentially toxic elements in extractive waste and soil from an abandoned mine site : Case study in Campello Monti, NW Italy. Science of The Total Environment, 651, 2799-2810. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.115</u>

Meng, Z., Huang, S., Laird, D. A., Wu, J., & Lin, Z. (2022). Identifying key processes driving Cd long-term adsorption and immobilization by biochar in soils and evaluating combined aging effects under simulated local climates. Journal of Environmental Chemical Engineering, 10, 108636. <u>https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.108636</u>

Monneron--Gyurits, M., Soubrand, M., Joussein, E., Courtin-Nomade, A., Jubany, I., Casas, S., Bahí, N., Faz, A., Gabarrón, M., Acosta, J. A., & Martínez-Martínez, S. (2020). Investigating the relationship between speciation and oral/lung bioaccessibility of a highly contaminated tailing : Contribution in health risk assessment. Environmental Science and Pollution Research, 27, 40732-40748. <u>https://doi.org/10.1007/s11356-020-10074-x</u>

Palmer, S., Cox, S. F., McKinley, J. M., & Ofterdinger, U. (2014). Soil-geochemical factors controlling the distribution and oral bioaccessibility of nickel, vanadium and chromium in soil. Applied Geochemistry, 51, 255-267. <u>https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2014.10.010</u>

Qin, J., Nworie, O. E., & Lin, C. (2016). Particle size effects on bioaccessible amounts of ingestible soil-borne toxic elements. Chemosphere, 159, 442-448. <u>https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.06.034</u>

Rauret, G., López-Sánchez, J. F., Sahuquillo, A., Rubio, R., Davidson, C., Ure, A., & Quevauviller, Ph. (1999). Improvement of the BCR three step sequential extraction procedure prior to the certification of new sediment and soil reference materials. Journal of Environmental Monitoring, 1, 57-61. <u>https://doi.org/10.1039/a807854h</u>

Ruby, M. V., Davis, A., Schoof, R., Eberle, S., & Sellstone, C. M. (1996). Estimation of Lead and Arsenic Bioavailability Using a Physiologically Based Extraction Test. Environmental Science & Technology, 30, 422-430. https://doi.org/10.1021/es950057z

Semple, Kirk. T., Doick, K. J., Jones, K. C., Burauel, P., Craven, A., & Harms, H. (2004). Defining Bioavailability and Bioaccessibility of Contaminated Soil and Sediment is Complicated. Environmental Science & Technology, 38, 228A-231A. <u>https://doi.org/10.1021/es040548w</u>

Serrano, M. F., López, J. E., Henao, N., & Saldarriaga, J. F. (2024). Phosphorus-Loaded Biochar-Assisted Phytoremediation to Immobilize Cadmium, Chromium, and Lead in Soils. ACS Omega, acsomega.3c07433. https://doi.org/10.1021/acsomega.3c07433

Shen, Z., Hou, D., Xu, W., Zhang, J., Jin, F., Zhao, B., Pan, S., Peng, T., & Alessi, D. S. (2018). Assessing long-term stability of cadmium and lead in a soil washing residue amended with MgO-based binders using quantitative accelerated ageing. Science of The Total Environment, 643, 1571-1578. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.321

Shen, Z., Hou, D., Zhao, B., Xu, W., Ok, Y. S., Bolan, N. S., & Alessi, D. S. (2018). Stability of heavy metals in soil washing residue with and without biochar addition under accelerated ageing. Science of The Total Environment, 619-620, 185-193. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.038</u>

Stewart, M. A., Jardine, P. M., Brandt, C. C., Barnett, M. O., Fendorf, S. E., McKay, L. D., Mehlhorn, T. L., & Paul, K. (2003). Effects of Contaminant Concentration, Aging, and Soil Properties on the Bioaccessibility of Cr(III) and Cr(VI) in Soil. Soil and Sediment Contamination: An International Journal, 12, 1-21. https://doi.org/10.1080/713610958

US EPA. (2017). Method 1340 (SW-846 Update VI). United States Environmental Protection Agency.

Wang, M., Xu, X., Han, Q., Lin, X., Yuan, H., Wang, M., Jiang, F., & Wang, W. (2023). Assessment of sourceoriented health risk associated with the oral ingestion of heavy metals in dust within an iron/steel smeltingaffected area of the North China Plain. Environmental Research, 237, 117101. <u>https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117101</u>

Wragg, J., Broadway, A., Cave, M. R., Fordyce, F. M., Palumbo-Roe, B., Beriro, D. J., Farmer, J. G., Graham, M. C., Ngwenya, B. T., & Bewley, R. J. F. (2017). Linkage between solid-phase apportionment and bioaccessible arsenic, chromium and lead in soil from Glasgow, Scotland, UK. Earth and Environmental Science Transactions of the Royal Society of Edinburgh, 108, 217-230. <u>https://doi.org/10.1017/S1755691018000762</u>

Xia, S., Song, Z., Jeyakumar, P., Bolan, N., & Wang, H. (2020). Characteristics and applications of biochar for remediating Cr(VI)-contaminated soils and wastewater. Environmental Geochemistry and Health, 42(6), 1543-1567. <u>https://doi.org/10.1007/s10653-019-00445-w</u>

Yang, X., Wang, L., Guo, J., Wang, H., Mašek, O., Wang, H., Bolan, N. S., Alessi, D. S., & Hou, D. (2022). Aging features of metal(loid)s in biochar-amended soil : Effects of biochar type and aging method. Science of The Total Environment, 815, 152922. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.152922</u>

Zapusek, U., & Lestan, D. (2009). Fractionation, mobility and bio-accessibility of Cu, Zn, Cd, Pb and Ni in aged artificial soil mixtures. Geoderma, 154, 164-169. <u>https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2009.10.012</u>

Zhang, N., Fang, Z., & Zhang, R. (2017). Comparison of Several Amendments for In-Site Remediating Chromium-Contaminated Farmland Soil. Water, Air, & Soil Pollution, 228, 400. <u>https://doi.org/10.1007/s11270-017-3571-</u> <u>6</u>

Zhao, R., Zhang, S., Gao, W., He, J., Wang, J., Jin, D., & Nan, B. (2019). Factors effecting the freeze thaw process in soils and reduction in damage due to frosting with reinforcement : A review. Bulletin of Engineering Geology and the Environment, 78, 5001-5010. <u>https://doi.org/10.1007/s10064-018-1430-3</u>

3.2.6. Bilan

Cette étude a permis de mettre en lumière plusieurs aspects concernant l'influence du vieillissement seul et avec apport d'amendements (biochar ou compost) sur la bioaccessibilité du Cr et du Ni et des autres EM dans les sols. Bien que le vieillissement seul semble avoir un impact sur la bioaccessibilité des EM, cette influence n'est pas clairement définie et varie selon le sol et l'EM considéré, et nécessitant des études plus approfondies. De même, l'effet des amendements est variable, bien que l'apport de biochar apparaisse moins bénéfique que celui du compost pour réduire la bioaccessibilité des EM. Cette incertitude remet en question la pertinence de l'utilisation des amendements pour gérer la bioaccessibilité des EM. Cependant, d'un point de vue opérationnel, les variations de bioaccessibilité observées sont relativement faibles, ce qui suggère un risque limité dans un contexte pratique. La combinaison de l'analyse minéralogique et de la distribution des éléments (extraction chimique séquentielle) a permis d'améliorer la compréhension des mécanismes sous-jacents à la bioaccessibilité, en particulier pour le Cr et le Pb. Leur affinité pour l'apatite explique leur forte bioaccessibilité lors de la dissolution de celle-ci et leur faible bioaccessibilité lors de sa reformation. En conclusion, bien que cette étude apporte des informations intéressantes, des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre et maîtriser l'influence du vieillissement et des amendements sur la bioaccessibilité des EM dans les sols.

Partie 3 : Etude de la validation du modèle in vitro UBM pour le chrome et le nickel

L'étude de la bioaccessibilité du Cr et du Ni a montré l'intérêt d'utiliser ces données pour améliorer l'évaluation des expositions à ces éléments du fait de leur faible BAc. Mais, avant de mettre en œuvre ces données dans les évaluations des risques sanitaires, il est indispensable de vérifier si la bioaccessibilité mesurée au moyen du test UBM permet d'approcher la biodisponibilité déterminée à partir d'un modèle animal. En vue de déterminer la biodisponibilité, l'expérimentation *in vivo* a été conduite sur le modèle porcelets exposés à 9 sols parmi ceux collectés dans le Lot 1. Dans un premier temps, les relations dose-réponse des formes de référence ont été étudiées pour avoir un aperçu des gammes de linéarité, des pentes ainsi que des organes cibles les plus appropriés à l'étude de la biodisponibilité du Cr et du Ni dans les sols. Bien que des études statistiques plus approfondies sont requises dans le but de s'assurer d'utiliser la pente de la relation dose réponse à la linéarité la plus significative (Travaux de thèse de Ronagul Turganova, L2A, Université de Lorraine), cette étude permet d'avoir un aperçu de la biodisponibilité relative du Cr et du Ni dans les 9 sols étudiés. Ces données de RBA *in vivo* pourront ensuite être comparées aux données de RBAc *in vitro* dans le but de vérifier si le test UBM peut être validé pour ces deux nouveaux EM selon les critères de corrélation IVIV (Chapitres 1 et 2).

3.3. Etude de la biodisponibilité du Cr et du Ni

- 3.3.1. Evaluation de la relation dose-réponse des formes de référence
- 3.3.1.1. Formes de référence, doses d'exposition et organes analysés

Les formes de référence, les doses d'exposition ainsi que les organes cibles retenus pour cette expérimentation ont été présentés dans le Chapitre 2. En rappel, pour le Ni, le choix s'est porté vers le sulfate de nickel (II) hexahydraté pour 7 doses allant de 0,044 à 1,25 mg kg⁻¹ PV j⁻¹. Pour le Cr, trois formes de référence ont été sélectionnées dans le but de tenir compte des différentes formes (en termes de spéciation et de solubilité) dans lesquelles il peut se trouver dans les sols, à savoir (i) le Cr VI avec le dichromate de sodium dihydraté avec 7 doses allant de 0,02 à 0,55 mg kg⁻¹ PV j⁻¹; (ii) le Cr III soluble avec l'hydroxyde d'acétate de chrome pour 7 doses comprises entre 0,104 et 3 mg kg⁻¹ PV j⁻¹; et (iii) le Cr III insoluble avec le picolinate de chrome et 6 doses allant de 0,104 à 1,714 mg kg⁻¹ PV j⁻¹. Les organes dans lesquels les concentrations de Cr et Ni ont été analysées sont les reins, les os (métacarpes), le foie ainsi que la rate. Les relations dose-réponse sont étudiées à l'aide des R²

déterminés statistiquement. Des études plus approfondies de la linéarité statistique des relations sont néanmoins requises avant de valider cette première étude.

Sulfate de Nickel (II) hexahydraté

La Figure 23 montre les relations dose-réponse du Ni dans les reins, les os, le foie et la rate. Les concentrations sont comprises entre 0,13 et 0,86 mg kg⁻¹ dans les reins, entre 0,05 et 0,20 mg kg⁻¹ dans les os, entre 0,03 et 0,05 mg kg⁻¹ dans le foie et entre 0,03 et 0,06 mg kg⁻¹ dans la rate. Dans le foie et la rate, les très faibles concentrations sont à la limite du bruit de fond résiduel. Ces organes ne semblent donc pas pertinents pour être utilisés comme cible pour le Ni. Concernant les os, bien qu'une relation dose-réponse est observée, les concentrations en Ni sont très faibles induisant une pente très faible (0,11) ainsi qu'un R² faible de 0,44. Cet organe ne semble également pas approprié à l'étude de la biodisponibilité du Ni.

Les concentrations les plus élevées sont observées dans les reins, induisant une pente plus élevée également (0,67) et un R² de 0,72 est observé. Ainsi, les reins semblent être un meilleur organe cible pour cette forme de référence du Ni.



Figure 23. Relations entre la concentration de Ni dans les organes cibles et les 7 doses d'exposition (0,044 - 1,25 mg kg⁻¹ PV j⁻¹) de Ni (sulfate de Ni (II) hexahydraté)

Néanmoins, la linéarité apparait diminuée à cause de la dernière dose (1,25 mg kg⁻¹ j⁻¹), l'hypothèse d'une saturation peut être émise. Ainsi, en retirant la dernière dose, la linéarité de la relation est améliorée. La Figure 24 présente la relation dose réponse pour les six premières doses allant de 0,044 et 0,714 mg kg⁻¹ PV j⁻¹. La pente pour cette relation est plus élevée (0,99) avec un R² de 0,73, qui reste similaire à la relation basée sur les 7 doses.



Figure 24. Relations entre la concentration de Ni dans les organes cibles et les 6 doses d'exposition (0,044 - 0,714 mg kg⁻¹ PV j⁻¹) de Ni (Ni (II) hexahydraté)

Concernant la forme de référence du Ni, le choix s'est porté sur le rein avec un domaine de linéarité allant de 0,044 à 0,714 mg kg⁻¹ PV j⁻¹, une pente de 0,99 et un R² de 0,73.

Dichromate de sodium dihydraté (Cr VI)

La Figure 25 montre les relations dose-réponse du Cr VI dans les reins, les os, le foie et la rate. Les concentrations sont comprises entre 0,03 et 0,33 mg kg⁻¹ dans les reins, entre 0,07 et 0,69 mg kg⁻¹ dans les os, entre 0,01 et 0,09 mg kg⁻¹ dans le foie et entre 0,06 et 0,07 mg kg⁻¹ dans la rate. Dans le foie et la rate, les concentrations sont à la limite du bruit de fond résiduel. Comme pour la forme de référence du Ni, ces organes ne semblent donc pas pertinents pour être utilisés comme organe cible pour l'étude de la biodisponibilité du Cr VI. Concernant les reins et les os, un domaine de linéarité est observé pour des doses testées comprises entre 0,02 et 0,55 mg kg⁻¹ PV j⁻¹ et avec un R² de 0,74 dans les reins et de 0,92 dans les os. Néanmoins, les deux dernières doses (les plus élevées) semblent décrocher légèrement de la linéarité. A nouveau, l'hypothèse de la saturation peut être émise.



Figure 25. Relations entre la concentration de Cr dans les organes cibles et les 7 doses d'exposition $(0,02 - 0,55 \text{ mg kg}^{-1} \text{ PV j}^{-1})$ (Dichromate de sodium dihydraté)

Ainsi, les deux dernières doses ont été retirées pour obtenir les relations dose-réponse présentées dans la Figure 26. Le R² est de 0,91 dans les reins et de 0,84 dans les os. Bien que le R² soit légèrement inférieur dans les os, ce qui peut s'expliquer notamment par la concentration élevée dans la dose 0, il pourrait être pertinent de privilégier cette cible pour laquelle la pente est plus élevée, augmentant ainsi les probabilités, par la suite, de détecter du Cr provenant des sols dans les os plutôt que dans les reins.



Figure 26. Relations entre la concentration de Cr dans les organes cibles et les 5 doses d'exposition $(0,02 - 0,18 \text{ mg kg}^{-1} \text{ PV j}^{-1})$ (Dichromate de sodium dihydraté)

Concernant la forme de référence du Cr VI, le choix s'est porté sur les os avec un domaine de linéarité allant de 0,02 à 0,18 mg kg⁻¹ PV j⁻¹, une pente de 1,17 et un R² de 0,84.

Acétate de chrome (Cr III – forme soluble)

La Figure 27 montre les relations dose-réponse du Cr III dans les reins, les os, le foie et la rate. Les concentrations sont comprises entre 0,20 et 1,99 mg kg⁻¹ dans les reins, entre 0,14 et 4,49 mg kg⁻¹ dans les os, entre 0,05 – 0,32 mg kg⁻¹ dans le foie et entre 0,08 – 0,21 mg kg⁻¹ dans la rate. La rate ne montre pas de relation dose-réponse linéaire et les concentrations sont trop proches du bruit de fond résiduel, il ne semble donc pas pertinent de l'étudier comme organe cible. Bien que le foie montre une relation dose-réponse linéaire, les concentrations en Cr sont très faibles, il ne semble également pas pertinent de l'étudier comme organe cible.

Concernant les reins et les os, un domaine de linéarité est observé pour des doses testées comprises entre 0,104 et 0,3 mg kg⁻¹ PV j⁻¹ et avec un R² de 0,80 dans les reins et de 0,81 dans les os. Néanmoins, la dernière dose pour les reins ainsi que les deux dernières doses dans les os semblent décrocher de la linéarité. A nouveau l'hypothèse de la saturation peut être émise.



Figure 27. Relations entre la concentration de Cr dans les organes cibles et les 7 doses d'exposition $(0,104 - 3 \text{ mg kg}^{-1} \text{ PV j}^{-1})$ (Acétate de chrome)

Ainsi, la dernière dose pour les reins et les deux dernières doses pour les os ont été retirées pour obtenir les relations dose réponses présentées dans la Figure 28. Le R² est de 0,88 dans les reins et de 0,86 dans les os. Comme pour la forme de référence avec le Cr VI, il semblerait plus pertinent de considérer les os comme organes cibles pour la suite des expérimentations sur les sols. En effet, la pente est plus élevée pour cet organe.



Figure 28. Relations entre la concentration de Cr dans les organes cibles et les 6 doses d'exposition $(0,104 - 1,714 \text{ mg kg}^{-1} \text{ PV j}^{-1})$ (Acétate de chrome)

Concernant la forme de référence soluble du Cr III, le choix s'est porté sur les os avec un domaine de linéarité allant de 0,104 à 1,714 mg kg⁻¹ PV j⁻¹, une pente de 2,01 et un R² de 0,86.

Picolinate de chrome (Cr III – forme insoluble)

Au regard des résultats obtenus sur les premières bandes de porcelets pour les trois premières formes de référence, il a été mis en évidence que les meilleures réponses avaient été obtenues avec les reins et les os et que la dernière dose avait tendance à être en dehors du domaine de la linéarité. C'est pourquoi, pour le picolinate, seules les 6 premières doses ont été testées dans le but de réduire le nombre de porcelets sacrifiés, et les organes analysés ont été limités aux reins et au os. La Figure 29 montre les relations dose-réponse du Cr III sous forme soluble dans les reins et les os. Les concentrations sont comprises entre 0,12 et 3,67 mg kg⁻¹ dans les reins et entre 0,17 et 0,70 mg kg⁻¹ dans les os. Concernant les os, une valeur aberrante est observée pour la quatrième dose à 0,56 mg kg⁻¹, qui n'est pas expliquée à ce jour. De plus, les concentrations de Cr dans cet organe étant très faibles, il ne semble pas pertinent de le considérer comme organe cible. Concernant les reins, une relation dose réponse est observée avec un R² de 0,88. Seulement, une rupture de la linéarité est observée pour les trois dernières doses. Il semble compliqué, sans une étude statistique plus approfondie, de faire une proposition en retirant ces dernières doses.

A ce stade, les résultats obtenus sur la forme de référence insoluble du Cr III ne sont pas assez robustes pour être considérés pour la suite de l'étude sur les sols.



Figure 29. Relations entre la concentration de Cr dans les organes cible et les 6 doses d'exposition $(0,105 - 0,95 \text{ mg kg}^{-1} \text{ PV j}^{-1})$ (picolinate de chrome)

3.3.1.2. Bilan sur la proposition des organes et des doses d'exposition

Globalement, un bruit de fond résiduel assez important est observé (traduit par les porcelets témoins à la dose 0), l'hypothèse peut être émise qu'une éventuelle contamination des porcelets a pu avoir lieu notamment au travers des cages en inox de l'animalerie, l'eau de boisson ou le matériel utilisé lors de la préparation des échantillons. Du fait de leur faible accumulation du Cr et du Ni, la rate et le foie ne semblent pas pertinents pour l'étude de la biodisponibilité de ces EM. La synthèse des organes retenus, des pentes ainsi que des intervalles de linéarité est présentée dans le Tableau 25 Une vérification statistique approfondie est requise pour valider la linéarité des relations dose-réponse observées précédemment. Globalement, il en ressort que l'accumulation du Cr et du Ni issus des formes de références, censées être les formes les plus solubles, dans les organes cibles est faible, voire très faible, ce qui se traduit par une pente faible également et laisse présager une faible biodisponibilité de ces deux EM. C'est pourquoi, il est probable que les concentrations de Cr et de Ni dans les organes des porcelets exposés aux sols contaminés soient également faibles.

 Organo	Nombro	Gammes des	Donto	Intercent	D ²
organe	Nombre		rente	intercept	N

Tableau 25. Synthèse des organes sélectionnés et des paramètres des relations dose-réponse pour les

	Organe	Nombre	Gammes des	Pente	Intercept	R ²
	cible	de doses	doses			
Sulfate de Nickel (II) hexahydraté	Reins	6	0,044 - 0,714	0,99	0,09	0,73
Dichromate de sodium dihydraté (Cr VI)	Os	5	0,02 - 0,19	0,80	0,08	0,82
Acétate de chrome (Cr III – forme soluble)	Os	5	0,104 - 0,98	2,21	0,24	0,82

La forme insoluble du Cr III a été écartée

Bien que ces premiers résultats doivent être vérifiés au travers d'analyses statistiques plus approfondies, les pentes déterminées graphiquement sur les gammes présentant les meilleures linéarités des relations dose-réponse ont été utilisées dans le but de donner une première estimation des RBA du Cr et du Ni dans les 9 sols étudiés.

3.3.2. Première estimation de la biodisponibilité relative (RBA) du Cr et du Ni dans les sols et comparaison à la bioaccessibilité relative (RBAc)

Les RBA estimées pour les 9 sols de cette étude sont globalement relativement faibles, avec certaines valeurs aberrantes (Tableau 27). Pour le Ni, les RBA sont comprises entre 5 et 656%. Parmi ces sols, 3 sols présentent des RBA supérieures à 100%, et correspondent aux 3 sols pour lesquels les doses de Ni administrées étaient les plus faibles ($0,007 - 0,053 \text{ mg kg}^{-1}$), les autres doses étaient jusqu'à 200 fois plus élevées ($0,160 - 1,573 \text{ mg kg}^{-1}$). Ainsi, ces RBA aberrantes sont probablement liées aux très faibles doses auxquelles les porcelets ont été exposés pour ces sols. En écartant ces trois sols, les RBA du Ni sont comprises entre 5 et 55% dans les reins. Concernant le Cr, pour la RBA calculée en se basant sur l'acétate de Cr (forme la plus soluble pour le Cr III), les RBA sont comprises entre 0,1 et 6,2% et pour la RBA basée sur le dichromate de Cr (forme pour le Cr VI), les valeurs sont comprises entre 0,6 et 51% dans les os. Bien que les pourcentages de RBA estimées pour le Cr ne soient pas supérieurs à 100%, il peut être observé que le sol FM16, pour lequel 51% de RBA est estimée en se basant sur le dichromate, la dose d'exposition était la plus faible ($0,03 \text{ mg kg}^{-1}$). Ainsi, cette RBA particulièrement élevée doit être étudiée de manière plus approfondie.

Concernant les données *in vitro*, les RBAc des sols ont été calculées en comparant la BAc absolue du Cr ou du Ni mesurée dans les sols (obtenues dans la partie 1), à la BAc absolue mesurée dans les formes de référence (Equations 2-2 et 2-2). Les BAc des formes de référence sont présentées dans le Tableau 26.

Tableau 26	 Bioaccessibilités 	absolues des	s formes de	e référence	dans les	phases	G et GI	(exprimées
en % par ra	apport aux concen	trations total	es, n = 5)					

Forme de référence	BAc G %	BAc GI %
Sulfate de Nickel (II) hexahydraté	95 ± 9	97 ± 3
Dichromate de sodium dihydraté (CrVI)	95 ± 6	102 ± 2
Acétate de chrome (CrIII – forme soluble)	61 ± 3	78 ± 8
Picolinate de chrome (Cr III – forme insoluble)	9 ± 1	30 ± 2

Le sulfate de Ni ainsi que le dichromate sont tous deux solubilisés en quasi-totalité dans les deux phases avec des BAc comprises entre 95 et 102%. La BAc de l'acétate de Cr est de 61% dans la phase G et de 78% dans la phase GI. La BAc du picolinate de Cr est la plus faible, elle est de 9% dans la phase G et de 30% dans la phase GI. Cette faible BAc est cohérente avec le fait qu'il s'agisse de la forme insoluble du Cr.

Tableau 27.	 Biodisponibilités 	relatives (RBA)	et bioaccessibilités	relatives (RB	Ac) dans les	phases G et (GI calculées	pour le Ni (a	u regard d	e sa f	orme de
référence) e	et pour le Cr (au r	egard des deux f	formes de référence	e pour le Cr I	II et le Cr VI) dans les 9 sol	s sélectionn	és pour la coi	mparaison	IVIV (données
exprimées e	en %)										

Sol	Cr mg	Ni mg	Doses d mg	'exposition kg ⁻¹ j ⁻¹	Su	lfate de Nick hexahydrat	el (II) té	Acéta	ite de chrom	e (Cr III)	Dic	hromate de s dihydraté (Cr	de sodium é (Cr VI)		
301	kg⁻¹	kg⁻¹	Cr	Ni	RBA	RBAc G	RBAc GI	RBA	RBAc G	RBAc GI	RBA	RBAc G	RBAc GI		
			-		%	%	%	%	%	%	%	%	%		
FM5	12175	98	1	0,020	284	11	12	0,2	6	3	1	3,9	2		
FD3	18494	11663	2,5	1,576	5	4	3	0,1	0,2	0,1	0,6	0,1	0,1		
FM3	2758	2044	1	0,741	10	20	21	0,1	10	0,8	1	6	0,6		
FM1	2902	41	0,5	0,007	656	14	14	0,2	12	2	2	8	1		
FM6	21079	290	1	0,053	138	11	8	3	5	0,8	20	3	0,6		
GR2	886	2356	0,2	0,532	18	10	7	1	1	0,4	8	0,7	0,3		
FM16	42	451	0,03	0,321	24	44	36	6	22	6	51	14	5		
B1	374	238	0,25	0,160	55	18	17	0,6	7	1	5	4,5	1		
FM26	777	861	0,4	0,443	19	11	7	0,3	7	3	2	4,2	2		

3.3.3. Bilan

Ces premiers résultats de RBA mettent en évidence des valeurs relativement faibles, ce qui est en accord avec les bioaccessibilités faibles également observées avec le test UBM. De plus, comme observé également avec les données *in vitro*, la RBA du Ni semble être plus élevée que celle du Cr. Néanmoins, ces premières estimations ne sont pas encourageantes car ne permettent pas en l'état de valider le test UBM pour ces deux EM. En effet, le critère recommandant une large gamme de valeur de RBA (70%) n'est ici pas respecté et la corrélation entre les RBA et RBAc ne sera probablement pas significative, ne permettant ainsi pas d'avoir une pente proche de 1 et un R² > 0,6. Des analyses statistiques complémentaires sont nécessaires en vue de confirmer ces premiers résultats et la non-validation du test UBM pour le Cr et le Ni. Il s'agira notamment de vérifier statistiquement les domaines de linéarité afin de s'assurer de l'utilisation de la pente la plus pertinente dans les calculs de RBA. Ces analyses feront l'objet de la thèse de Ronagul Turganova (L2A, Université de Lorraine), qui traite plus spécifiquement la biodisponibilité orale.

Chapitre 4 : Etude de la mise en œuvre de la bioaccessibilité orale des éléments métalliques dans la gestion des sites et sols pollués

Il existe aujourd'hui un consensus sur la pertinence de l'utilisation de la bioaccessibilité comme outil pour affiner l'estimation de l'exposition de l'Homme aux EM. Cependant, son utilisation fait face à des freins identifiés dans le Chapitre 1 qui sont notamment liés au nombre restreint d'EM pour lesquels le test UBM est valide IVIV ainsi qu'à certaines pratiques et incertitudes rencontrées lors de l'intégration des données de bioaccessibilité dans les calculs de risques. Dans le Chapitre 3.3., il a été mis en avant la complexité de la validation IVIV du test UBM pour les EM présentant de faibles biodisponibilités. Leur bioaccessibilité ne peut donc actuellement pas être intégrée aux calculs de risques. Ainsi, ce chapitre vise, en première partie, à décrire de manière très opérationnelle la méthodologie d'intégration de la bioaccessibilité dans l'évaluation de l'exposition humaine et *in fine* des risques sanitaires, et ce, pour les trois EM (As, Cd et Pb) pour lesquels le test UBM est validé IVIV (Figure 30). Pour illustrer la démarche particulièrement pour le Pb, une étude de cas a été réalisée sur un territoire pilote d'Ile-de-France et est présentée en seconde partie de ce chapitre.



Figure 30. Schéma des points d'attention traités dans le cadre de la mise en œuvre de la méthodologie d'intégration de la bioaccessibilité orale dans l'évaluation de l'exposition et des risques sanitaires
Partie 1 : Intégration de la bioaccessibilité orale d'As, Cd et Pb dans les évaluations quantitatives des risques sanitaires

Bien que le test UBM soit préconisé dans la Méthodologie nationale de gestion des sites et sols pollués (MTES, 2017) pour évaluer la bioaccessibilité, sa mise en œuvre et son intégration dans les calculs de risques sanitaires ont encore besoin d'être clarifiés et diffusés afin de lever tout doute ou incompréhension de la méthodologie. Les interrogations débutent lors du choix du mode de préparation des échantillons, dont les pratiques ne respectent pas toujours les objectifs, normes et recommandations (NF ISO 11464 ; ISO 17924). Par ailleurs, il a été observé que les modalités de prise en compte de la bioaccessibilité dans l'ajustement de la dose journalière d'exposition (DJE), qui sont à ce jour basées sur le rapport InVS-Ineris de 2012, sont parfois compliquées à appliquer notamment en lien avec le facteur 2 qui vient pondérer la BAc du Pb et qui limite son utilisation dès lors que sa valeur est supérieure à 50%. Cela induit qu'au lieu de prendre la valeur de BAc la plus élevée ou celle qui présente les meilleures corrélations IVIV, comme recommandée dans le rapport InVS-Ineris (2012), mesurée dans la phase G pour le Pb, c'est la BAc dans la phase GI qui est parfois utilisée. Un cadrage opérationnel est nécessaire afin d'homogénéiser les pratiques et d'assurer la reproductibilité des études. Ainsi, une révision de la méthodologie est nécessaire et a pour objectif de réinsister sur les bonnes pratiques à respecter, que ce soit en termes de préparation des échantillons, de protocoles à suivre, du choix de la phase et d'intégration de la valeur de BAc dans les ERS. Il s'agit notamment de rappeler les généralités des calculs des expositions et des risques, ainsi que les recommandations de la méthode InVS-Ineris (2012) suivie jusqu'à ce jour jusqu'à la sortie du nouveau guide national en termes de choix de phase (gastrique ou gastro-intestinale) et d'ajustement de l'exposition. L'objectif de cette partie est de réviser cette méthodologie en proposant une nouvelle démarche pour As, Cd et Pb permettant notamment de lever le frein précité sur l'utilisation de la BAc pour Pb.

4.1.1. Influence du mode de préparation des sols sur la bioaccessibilité orale des EM

L'amélioration des techniques de diagnostic ainsi que de la compréhension des problématiques permet de mettre à jour régulièrement les recommandations, aidant ainsi à l'amélioration continue de la gestion des SSP. Classiquement dans les ERS, l'exposition de l'Homme liée à l'ingestion non intentionnelle de sol est évaluée sur la base de la concentration totale de contaminants analysées suivant la NF ISO 11464 (2006)² dans les sols prélevés lors des diagnostics initiaux sans objectif de mise

² Ou parfois la NF 16174 qui elle intègre une étape de concassage avant le tamisage.

en œuvre de la bioaccessibilité. Dans cette norme, la préparation consiste à tamiser l'échantillon de sol à 2 mm, puis de le broyer jusqu'à ce que l'échantillon passe en totalité au travers d'un tamis à 250 μ m ; le broyage étant une pratique courante des laboratoires, sans demande contraire spécifique du BE au regard des objectifs de son étude. Cette procédure classique de préparation des sols via le broyage a pour objectif d'améliorer la représentativité de l'analyse et de favoriser la solubilisation des polluants quelle que soit la nature des compartiments où ils se trouvent. Cette méthode nécessite également de prélever en amont une moins grande quantité de sol puisque seuls les éléments grossiers > à 2 mm sont exclus de la préparation.

La volonté d'affiner et d'améliorer le réalisme de l'estimation de l'exposition a émergé avec l'utilisation de la bioaccessibilité et l'utilisation d'une fraction plus représentative de l'exposition d'intérêt. En effet, pour la voie d'exposition liée à l'ingestion non intentionnelle de sol, l'utilisation d'une fraction plus fine, tamisée à <250 μm, est plus pertinente dans la mesure où cette dernière est davantage représentative de la fraction susceptible d'adhérer aux mains des enfants et donc d'être ingérée (Cave et al., 2011 ; Paustenbach, 2000 ; Yamamoto et al., 2006). C'est pourquoi, le protocole du test UBM, décrit dans la norme ISO 17924, recommande l'utilisation de la fraction de sol tamisée à <250 μm, et depuis sa version révisée de 2019, sans avoir recours à un broyage mécanique des sols, lors de la mesure de la bioaccessibilité mais aussi de la concentration totale de contaminant du sol. Le respect de ce protocole de préparation a d'autant plus d'importance lorsque la BAc est également exprimée en pourcentage par rapport à la concentration totale. En effet, un biais peut être introduit si les deux paramètres sont déterminés via des protocoles différents (tamisé versus broyé). Cette pratique peut être liée à un manque de sensibilisation ainsi qu'à des pratiques établies dans les méthodologies utilisées par les laboratoires d'analyses ou les bureaux d'étude, ainsi que NF ISO 11464 (2006), sont appliquées pour la détermination de la concentration totale, sans tenir compte des recommandations de guides tels que "Diagnostics des sites et sols pollués" version d'avril 2023 (MTECT, 2023) qui souligne l'importance du choix d'une fraction représentative du contexte d'étude, c'est-à-dire de l'exposition d'intérêt (e.g. le choix d'une fraction fine cohérente avec l'ingestion involontaire de sol). Cette procédure peut néanmoins tendre à fausser l'évaluation de l'exposition des populations en lien avec l'ingestion non intentionnelle de particules de sol dans la mesure où la fraction fine est celle qui a tendance à présenter les concentrations en contaminants les plus élevées (Goix et al., 2016; Ma et al., 2019). En effet, si la concentration totale mesurée dans la fraction broyée est inférieure à celle mesurée dans la fraction tamisée, le pourcentage de bioaccessibilité calculé risque d'être surestimé (voire parfois être > à 100%) par rapport à celui déterminé sur la fraction tamisée. Une surestimation de la bioaccessibilité va à l'encontre de l'objectif premier d'affiner l'évaluation des expositions et des risques. L'étude de cas réalisée sur un territoire pilote d'Ile-deFrance, présentée dans la partie 2 de ce chapitre, illustre bien l'impact sur les résultats de l'évaluation des risques lorsque le protocole UBM n'est pas respecté.

4.1.2. Modalités de prise en compte de la bioaccessibilité dans les calculs des risques

4.1.2.1. Généralités sur les calculs des expositions et des risques

Le risque correspond au croisement d'une exposition et d'un danger (Figure 31). Le danger est représenté par une valeur toxicologique de référence³ (VTR).



Figure 31. Schéma du risque, croisement entre un danger et une exposition

Pour l'évaluation de l'exposition en cas d'ingestion non intentionnelle de terre contaminée, est calculée pour chaque substance une dose journalière d'exposition (DJE) selon l'équation 4-1.

$$DJE = \frac{C \times Q \times F}{P} \times \frac{T}{Tm} \times 10^{-6}$$
 Equation 4-1.

Avec la DJE la dose journalière d'exposition (mg kg_{PC}⁻¹ jour⁻¹) ; C la concentration totale en polluant dans la terre (mg kg⁻¹) ; Qs la quantité de terre ingérée par jour (mg jour⁻¹) ; P le poids corporel de la cible (kg_{PC}) ; F la fréquence annuelle d'exposition (nombre de jours d'exposition annuelle sur 365 j) (sans unité)) ; T la durée d'exposition (année) ; Tm la durée sur laquelle est moyennée l'exposition (année) ; pour les substances à effets à seuil : Tm (année) = T (année) ; pour les substances à effets sans seuil : Tm (année) = 70 (année)) (vie entière de 70 années par convention) ; 10⁻⁶ le facteur de conversion.

Pour les substances à effets à seuil, le risque est caractérisé par le calcul du quotient de danger (QD) en prenant en compte la VTR (mg kg_{PC}^{-1} jour⁻¹) associée aux effets à seuil selon l'équation 4-2.

$$QD = \frac{DJE}{VTR}$$
 Equation 4-2.

³ Les VTR sont des valeurs établies par des experts scientifiques, basées sur des expérimentations (animales, cellules...) et/ou des études épidémiologiques humaines. La VTR (à effets à seuil ou effets sans seuil) est une appellation générique regroupant tous les types d'indice toxicologique permettant d'établir une relation entre une dose et un effet (toxique à seuil d'effet) ou entre une dose et une probabilité d'effet (toxique sans seuil d'effet).

Pour les substances à effet sans seuil, le risque correspond à la probabilité pour la cible de développer l'effet associé à la substance pendant sa vie entière. Il est appelé excès de risque individuel (ERI) et est calculé selon l'équation 4-3 tenant compte de la VTR ((mg kg_{PC}⁻¹ jour)⁻¹) associée aux effets sans seuil.

$$ERI = DJE \times VTR$$
 Equation 4-3.

Classiquement, lors du calcul de la DJE, la concentration totale en contaminant est prise en compte, de manière conservatoire en considérant que la totalité du contaminant ingéré est biodisponible. Ne pas considérer la biodisponibilité réelle conduit, dans la majorité des cas, à surestimer les niveaux des risques associés à l'ingestion non intentionnelle de terre. Il est important de prendre en compte ce paramètre en vue d'affiner au mieux les calculs des expositions et des risques et de proposer des modalités de gestion les plus adéquates.

En France, les VTR sont choisies suivant la note d'information N° DGS/EA1/DGPR/2014/307 du 31 octobre 2014. La Figure 32 présente le logigramme pour l'aide au choix de la VTR pour mener les évaluations des risques sanitaires dans le cadre des études d'impact et de la gestion des SSP.



Figure 32. Schéma tiré du logigramme des modalités de choix des VTR en France (N° DGS/EA1/DGPR/2014/307 du 31 octobre 2014)

Les VTR retenues actuellement pour l'As, le Cd et le Pb sont présentées dans le Tableau 28. Il est important de suivre régulièrement les dernières mises à jour des organismes élaborateurs car les VTR sont susceptibles de changer avec le temps selon la parution de nouvelles études toxicologiques, ainsi que de vérifier l'absence d'une nouvelle version de la note de la DGS précitée (des travaux d'actualisation étant en cours).

			VTR externe	Factour global			Etude(s) source(s)		
5	Substance	Type d'effet	(Organisme, année dernière révision)	d'incertitudes utilisé dans l'élaboration de	Effet critique	Point de départ	Etude expérimentale animale : espèce, matrice	Etude épidémiologique : matrice d'exposition des	
			[Critère de choix - note DGS (2014)]	la VTR (et détail⁴)			d'exposition et forme de référence	populations humaines	
			0,3 μg kg ⁻¹ j ⁻¹ (HAS, 2020)						
As inorganique	As inorganique	Effets à seuil	[expertise collective nationale : HAS de 2020] (Nota : valeur numérique identique à celle de l'US EPA (1991), mais autres études sources et autres points de départ)	3 (3 : variabilité inter- individuelle)	Mélanodermie et hyperkératose cutanées	ВМСL ₀₁ (0,3 µg L ⁻¹) et BMDL ₀₁ (0,9 µg kg ⁻¹ j ⁻ ¹)		Population exposée par apports eau de boisson et alimentaires d'arsenic (Xia et al., 2009)	
	As	Effets sans seuil	1,5 (mg kg ⁻¹ j ⁻¹) ⁻¹ (OEHHA, (2011) (<i>expertise</i> <i>collective nationale</i> : <i>HAS</i> , 2020)] (Nota : valeur numérique identique à celle de l'US EPA, 1998 ; mêmes études sources)	/	Cancers cutanés			Population consommant de l'eau de boisson contaminée par l'arsenic inorganique (OEHHA, 2011 ; Tseng et al., 1968 ; Tseng, 1977)	

 Tableau 28. Informations toxicologiques et valeurs toxicologiques de référence

⁴ variabilité intra-espèces (extrapolation des données expérimentales à l'homme) ; variabilité inter-espèce (différence de sensibilité au sein de l'espèce humaine) ; etc.

Cd	Effets à seuil	0,35 μg kg ⁻¹ j ⁻¹ (ANSES, 2017) [VTR élaborée par l'ANSES]	Absence de facteur d'incertitude supplémentaire VTR : études épidémiologiques menées sur la population générale	Système osseux (Ostéoporose ou la fracture osseuse)	Dose interne, la dose critique : Cd urinaire de 0,5 µg g ⁻¹ de créatinine) ; concentration retenue pour dériver la VTR externe		Etudes épidémiologiques menées sur la population générale (Engström et al., (2011, 2012)
Pb inorganique	Effets à seuil	0,63 µg kg ⁻¹ .j ⁻¹ [Anses, 2013] [VTR élaborée par l'ANSES]		Effets rénaux	Dose interne (15 μg L ⁻ ¹) pour adulte BMDL ₀₁ : EFSA (2010) Protège l'ensemble de la population, enfant et adulte (Anses, 2013)		Etudes épidémiologiques
Pb et ses dérivés inorganiques	Effets sans seuil	8,5 (μg kg ⁻¹ j ⁻¹) ⁻¹ [OEHHA, 2011] [Expertise collective nationale]	/	Tumeurs rénales		Etude expérimentale rats ; nourriture enrichie en Pb sous forme d'acétate	

4.1.2.1. Ajustement de la DJE par la bioaccessibilité : méthode InVS-Ineris (2012)

La seule démarche disponible à ce jour pour le calcul de la DJE ajustée, spécifiquement pour As, Cd et Pb, présentée dans un document national est celle proposée dans le rapport InVS-Ineris (2012), issue des réflexions d'un groupe de travail national. L'ajustement de la DJE par la biodisponibilité relative (RBA) est présenté dans l'équation 4-5.

$$DJE_{aiustée} = DJE \times RBA$$
 Equation 4-5.

La DJE ajustée peut être directement comparable à la VTR disponible dans la littérature (dose externe au moment du rapport). Pour déterminer la RBA, deux alternatives sont possibles : (i) connaitre les BAc absolues de l'élément dans le sol et dans la matrice de référence ayant servi à l'élaboration de la VTR ; (ii) connaitre en absolu ou en relatif, les paramètres de bioaccessibilité et d'absorption de l'élément d'intérêt. La RBA peut être exprimée en fonction de la BAc selon l'équation suivante :

$$RBA = \frac{ABA_{sol}}{ABA_{VTR}} = \frac{BAc_{sol} \times af_{sol}}{BAc_{VTR} \times af_{VTR}}$$
 Equation 4-6.

Avec ABA la biodisponibilité absolue du composé dans le sol ou dans la matrice utilisée pour l'élaboration de la VTR ; BAc la concentration de contaminant extraite par les fluides digestifs dans le sol ou dans la matrice utilisée pour l'élaboration de la VTR ; af le facteur d'absorption du composé du sol ou de la matrice utilisée pour l'élaboration de la VTR.

Cas de l'arsenic et du cadmium

Lors de l'élaboration de la démarche de calcul de la DJE ajustée proposée dans le rapport de l'InVS-Ineris (2012), la VTR retenue pour le Cd était la VTR proposée par l'EFSA (2009), à savoir une dose hebdomadaire tolérable 2,45 µg kg⁻¹ équivalente à 0,35 µg kg_{PC}⁻¹ j⁻¹ avec comme organe critique les reins. Pour l'As, les VTR pour effets dans seuil ou avec seuil n'ont pas été révisées depuis et sont présentées dans le Tableau 28. Il a été démontré que pour l'As et le Cd, l'absorption dans le sol était égale à l'absorption dans l'eau de boisson (utilisée pour l'élaboration de la VTR) (af_{sol} = af_{VTR}) (RIVM, 2000), ce qui permet la simplification suivante en partant de l'équation 4-6 :

$$RBA = \frac{BAc_{sol}}{BAc_{VTR}}$$
 Equation 4-7.

De plus, les BAc des formes de référence (BAc_{VTR}) dans la phase gastrique de ces éléments sont proches de 100% (Caboche, 2009) (BAc_{VTR} \approx 1). Ainsi pour l'As et le Cd, il est possible d'ajuster directement la DJE par la BAc absolue mesurée dans le sol :

$$RBA = BAc_{sol}$$
 Equation 4-8.

$$DJE_{ajustée} = DJE \times BAc_{sol}$$
 Equation 4-9.

Cas du plomb

Lors de l'élaboration de la démarche de calcul de la DJE ajustée proposée dans le rapport de l'InVS-Ineris (2012), la VTR pour les effets à seuil retenue était la VTR proposée par l'OMS (2011), à savoir une dose hebdomadaire tolérable de 25 µg kg⁻¹ équivalente à 3,6 µg kg_{PC}⁻¹ j⁻¹ et qui prend en compte toutes les voies d'exposition (eau, air, nourriture) avec l'objectif de ne pas dépasser une plombémie de 50 µg L⁻¹ chez les enfants. Il a été démontré que l'absorption du Pb dans la nourriture est comprise entre 20% et 80% chez l'enfant selon l'âge (DeMichele et al., 1984 ; Ziegler et al., 1978) et que la biodisponibilité absolue du Pb dans la matrice de référence (nourriture) a été estimée à 40% en moyenne (fraction absorbée = fraction biodisponible du fait d'une absence de métabolisation du plomb) (Oomen et al., 2006). Ainsi en injectant ces informations dans l'équation 4-6, pour le Pb, l'ajustement suivant est obtenu (Equation 2-8) :

$$DJE_{ajust\acute{e}e} = DJE \frac{BAc_{sol} \times 0.8}{0.4} = DJE \times 2 \times BAc_{sol}$$
 Equation 4-10.

Avec $DJE_{ajustée}$ la dose journalière d'exposition ajustée (mg kg_{PC}⁻¹ j⁻¹) ; BAc_{sol} la bioaccessibilité du composé dans la matrice du sol (fraction) ; 0,8 (80%) la valeur maximale d'absorption du Pb et 0,4 (40%) la biodisponibilité moyenne du Pb dans la matrice de la VTR.

Cette méthode a considéré des paramètres protecteurs de manière sécuritaire en particulier par l'utilisation des 80% d'absorption chez l'enfant.

Recommandation sur le choix de la phase

Dans le rapport de l'InVS-Ineris de (2012), il est recommandé soit de retenir la valeur de bioaccessibilité la plus élevée entre les deux phases pour être dans une démarche conservatoire, soit celle qui présente les meilleures corrélations avec la biodisponibilité relative lors des études *in vivo*. En rappel, le test UBM simule deux phases : la phase gastrique qui permet d'étudier le comportement des contaminants dans l'estomac et la phase gastro-intestinale qui permet d'être plus représentative des conditions physiologiques humaines le long du tractus en tenant compte des variations de composition des fluides digestifs.

Concernant la phase dans laquelle la bioaccessibilité la plus élevée est observée, pour le Cd et le Pb, il s'agit majoritairement de la phase G (Chapitre 1 ; Chapitre 3.1) du fait de leur sensibilité au pH acide de cette phase (pH de 1,2) entraînant une plus forte solubilisation que dans la phase intestinale (pH

de 6,3). Pour l'As, les concentrations extraites ont tendance à être similaires entre les deux phases avec quelques cas ou G>GI ou G<GI.

Du point de vue des corrélations *in vitro/in vivo (IVIV)*, la Figure 33 présente les résultats obtenus pour le Cd, le Pb et l'As lors de la validation du test UBM au regard du modèle porcelet (Caboche, 2009). Pour le Cd et le Pb, les critères de validation/robustesse sont respectés pour les deux phases digestives simulées au sein du test UBM (Chapitre 1 et 2). Par conséquent, les valeurs de BAc G et Gl obtenues par le test *in vitro* UBM permettent d'estimer la RBA du Cd et du Pb dans les sols. Cependant, les résultats ont montré une dispersion des valeurs BAc relative plus importante dans le cas de la phase Gl. Cette variation peut être expliquée par le fait que pour certains sols, les écarts entre BAc G et Gl ne sont pas corrigés, même lorsque la bioaccessibilité est exprimée sous forme relative en comparaison à la BAc des formes de référence (Cf. Chapitre 2). Concernant l'As, les critères de validation sont respectés et les corrélations *in vivo/in vitro* sont similaires dans la phase G et Gl, ce qui peut expliquer le fait que sa bioaccessibilité a tendance à être similaire dans les deux phases et que l'As n'est pas influencé par le pH des différents compartiments.

Ainsi, au regard des bonnes corrélations IVIV, et également de la recommandation de considérer la plus forte BAc entre les deux phases, le choix de la valeur de bioaccessibilité dans la phase G est plus adapté pour le Cd et le Pb. Pour l'As, comme sa distribution dans les deux phases est variable et que les deux phases présentent de bonnes corrélations IVIV, le choix de la phase à considérer doit être réalisé au cas par cas en sélectionnant la valeur de bioaccessibilité la plus élevée.

La méthodologie InVS-Ineris proposée en 2012 limite l'utilisation de la BAc du Pb car dans la phase G, cette dernière est souvent supérieure à 50% comme observé dans la littérature. Ainsi, avec le facteur d'ajustement de 2, son intégration dans le calcul de la DJE ajustée n'est pas pertinente car elle ne permet pas d'affiner l'évaluation de l'exposition. Par exemple, un sol avec une BAc du Pb de 60% dans la phase G, résulte à ajuster la DJE par 120% de RBA, ce qui *in fine* aboutit à une DJE_{ajustée} plus élevée que celle calculée initialement avec la concentration totale en Pb dans le sol.

172



Figure 33. Corrélations entre la bioaccessibilité gastrique ou intestinale relative (Bioacc rel (%)) déterminée par le test *in vitro* UBM et la biodisponibilité relative (BR (%)) déterminée à partir des données obtenues dans les organes (As n=13 ; Cd n=10 ; Pb n=14)

La ligne en trait plein représente la meilleure droite d'ajustement des données et les caractéristiques de cette droite sont regroupées au sein du tableau : pente (a), ordonnée à l'origine (b), écart-type (ET) de la pente et de l'ordonnée à l'origine et le coefficient de détermination r^2 , ** indique que r^2 est statistiquement significatif (p < 0,01) (Caboche, 2009)

4.1.2.3. Nouvelle proposition d'intégration de la bioaccessibilité pour les éléments d'intérêt (As, Cd, Pb)

Les réflexions sur une nouvelle méthode ont débuté lorsqu'il a été constaté que le facteur 2 appliqué pour ajuster la DJE au Pb conduisait à limiter l'utilisation de sa bioaccessibilité dans les études ERS par certains acteurs des SSP (i.e. BAc étant souvent supérieure à 50%), (mis également en évidence au travers de l'enquête nationale réalisée dans le cadre du GT national « Bioaccessibilité orale des métaux et métalloïdes»⁵). Initialement, la question s'est posée de chercher d'autres valeurs pour les paramètres intervenant dans l'approche Invs-Ineris (2012) (par exemple, le facteur d'absorption et la biodisponibilité absolue du Pb). Mais cette piste n'a pas abouti en l'absence d'études pertinentes plus récentes dans la littérature. C'est pourquoi, la nouvelle méthodologie vise à repartir des données disponibles, à savoir les corrélations IVIV établies lors des travaux de thèse de Caboche (2009) sur la validation du test UBM pour l'As, le Cd et le Pb, permettant ainsi de calculer la RBA à partir de la bioaccessibilité relative (Tableau 29).

Tableau 29. Equations de la biodisponibilité relative (RBA) en fonction de la bioaccessibilité relative (RBAc) de l'As, du Cd et du Pb dans les phases gastrique (G) et gastro-intestinale (GI)

1			
	Elément	Phase G	Phase GI
	As	RBA = 1,00 x RBA _C + 0,01	RBA = 0,99 x RBA _C - 0,04
	Cd	$RBA = 1,04 \times RBA_{C} - 2,77$	RBA = 1,06 x RBA _C - 1,52
	Pb	RBA = 0,91 x RBA _C – 1,69	RBA = 0,92 x RBA _C - 1,00

La RBAc correspond au ratio de la bioaccessibilité absolue (BAc) de l'EM dans la matrice sol par rapport à celle dans une forme de référence considérée comme la forme la plus soluble (forme de référence généralement utilisée lors des essais *in vivo* pour l'établissement de certaines VTR). Dans le cas de l'As, Cd et Pb, les formes de références étudiées étaient respectivement l'arséniate de sodium, le chlorure de cadmium et l'acétate de plomb et sont présentées dans le Chapitre 2. Le Tableau 30 présente les BAc absolues des formes de référence obtenues dans les phases G et GI à l'issue du test UBM (Chapitre 2 ; Caboche, 2009).

Tableau 30. Bioaccessibilités absolues (BAc) dans la phase gastrique (G) et gastro-intestinale (GI) de
l'As, du Cd et du Pb mesurées dans les formes de références (données exprimées en % par rapport
aux concentrations totales, n = 5)

Elément	BAc G	BAc GI			
As	95 ± 3%	92 ± 4%			
Cd	98 ± 4%	68 ± 3%			
Pb	99 ± 2%	65 ± 3%			

⁵ Ce groupe de travail a été initié à la demande du ministère en charge de l'environnement, piloté par l'Ineris et constitué notamment d'institutions, d'universités, d'administrations (DRIEAT, DREAL, ARS), de maîtres d'ouvrage, de bureaux d'études et de laboratoires d'analyses

Ainsi, ces données sont intégrées aux équations présentées dans le Tableau 29 pour pouvoir déterminer la RBA à partir des BAc absolues dans les sols et dans les matrices de référence. Les équations ainsi obtenues sont présentées dans le Tableau 31.

RBA	Equations phase G	Equations phase GI
As	$1,00 \times \frac{BAc As G}{0,95} + 0,01$	$0,99 \times \frac{BAc As GI}{0,92} - 0,04$
Cd	$1,04 \times \frac{BAc \ Cd \ G}{0,98} - 2,77$	$1,06 \times \frac{BAc \ Cd \ GI}{0,68} - 1,52$
Pb	$0,91 \times \frac{BAc \ Pb \ G}{0,99} - 1,69$	$0,92 \times \frac{BAc \ Pb \ GI}{0,65} - 1,00$

Tableau 31. Equations de la biodisponibilité relative (RBA) en fonction des bioaccessibilités absolues (BAc) dans le sol et la matrice de référence, et ce pour l'As, le Cd et le Pb (données exprimées en %)

4.1.3. Bilan

L'objectif de cette première partie était de proposer une méthodologie opérationnelle pour l'utilisation de la bioaccessibilité et de réviser la démarche limitante pour le Pb proposée par l'InVS-Ineris (2012). Au moment de la préparation des échantillons, il est crucial d'utiliser une fraction de sol représentative de la voie d'exposition concernée lors des mesures des concentrations totales ainsi que de bioaccessibilité, en appliquant les recommandations du protocole du test UBM (NF ISO 17924 :2019). Pour l'ingestion de sol, la fraction tamisée à <250 μ m (sans avoir recours à un broyage mécanique) est recommandée, car elle est plus susceptible d'adhérer aux mains et donc d'être ingérée. Cette nouvelle approche permet de ne plus restreindre l'utilisation des données de BAc du Pb lorsque qu'elles sont supérieures à 50%. Elle est basée sur l'utilisation des équations IVIV permettant d'estimer la RBA par le BAc absolue des EM dans les sols. La recommandation de l'InVS-Ineris (2012) concernant le choix de la phase est toujours d'actualité : la valeur de la phase présentant la bioaccessibilité la plus élevée ou celle montrant les meilleures corrélations IVIV doit être choisie. Il d'agit de la phase G pour le Cd et le Pb. Pour l'As le choix doit être réalisé au cas par cas en sélectionnant la phase présentant la bioaccessibilité la plus élevée dans la mesure où les corrélations IVIV sont équivalentes et sa distribution entre les deux phases est variable. Ainsi, les équations suivantes peuvent être proposées en intégrant les données de BAc des formes de matrice (Equations 4-11 à 4-14) :

RBA As
$$G = 1,00 \times \frac{BAc As G}{0,95} + 0,01$$
 Equation 4-11.

RBA As GI = 0,99 $\times \frac{BAc As GI}{0,92} - 0,04$	Equation 4-12.
RBA Cd G = $1,04 \times \frac{BAc Cd G}{0,98} - 2,77$	Equations 4-13.
RBA Pb G = $0.91 \times \frac{BAc Pb G}{0.99} - 1.69$	Equation 4-14

Partie 2 : Etude de la bioaccessibilité du Pb sur un territoire pilote d'Ile-de-France

La partie précédente propose une nouvelle méthodologie sur l'intégration de la bioaccessibilité dans les évaluations des risques sanitaires. Pour illustrer la démarche, une étude de cas a été conduite spécifiquement sur Pb dans des sites d'Ile-de-France (Figure 34) et a fait l'objet d'un article scientifique soumis dans le Environmental Geochemistry and Health (EGAH). Plus spécifiquement, la nouvelle approche d'intégration de la RBA dans les calculs des expositions et des risques a été comparée à l'approche classique basée sur la concentration totale. Les résultats des risques avec la démarche InVS-Ineris (2012) encore utilisée actuellement sont également présentés à titre illustratif. Pour cela, 5 scénarios d'exposition ont été considérées (adulte jardinier, adulte/enfant dans un parc public, adulte/enfant dans une zone résidentielle). Un focus est également fait sur l'importance du respect de la norme ISO 17924:2019 en termes de préparation des échantillons (i.e., utilisation d'une fraction de sol tamisée à <250 µm sans avoir recours à un broyage mécanique) pour la détermination des concentrations totales et bioaccessibles et particulièrement dans le cas où la BAc est exprimée en pourcentage par rapport à la concentration totale.



Figure 34. Graphical abstract illustrant la démarche expérimentale suivie sur cette étude pilote en Ilede-France

Human health risk assessment of lead exposure from soil ingestion in a French pilot study: Insights from the application of a new bioaccessibility approach

Madeleine Billmann^{1,2*}, Aurélie Pelfrêne^{1*}, Arnaud Papin³, Benjamin Pauget⁴, Rabia Badreddine³, Corinne Hulot³

¹Univ. Lille, IMT Nord Europe, Univ. Artois, JUNIA, ULR 4515 - LGCgE, Laboratoire de Génie Civil et géo-Environnement, 48 boulevard Vauban, F-59000 Lille, France

²Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie, 20 avenue du Grésillé BP 90406, F-49004 Angers Cedex 01, France

³Ineris, Parc technologique Alata, BP 2, F-60550 Verneuil-en-Halatte, France

⁴Tesora, 41 rue du Périer 92120, Montrouge, France

*corresponding authors: madeleinebillmann@gmail.com and aurelie.pelfrene@junia.com

Abstract

Despite the consensus on the importance of considering the bioavailability of metal(loid)s by measuring their bioaccessibility when assessing exposure, integrating these parameters into risk calculations often involves proprietary approaches that lack adequate justification. This is the case with the *in vitro* unified bioaccessibility method (UBM), which is widely used in Europe to assess the bioaccessibility of metal(loid)s in the event of soil ingestion. This study proposes a comprehensive operational approach that incorporates bioaccessibility to refine human exposure and risk assessments. A pilot study of 45 Pb-contaminated soil samples collected in and around Paris highlighted the importance of carefully following soil preparation protocols. Specifically, sieving the soil to 250 µm without mechanical milling is recommended for determining both bioaccessible and total concentrations. A simplified test using dilute hydrochloric acid can predict the bioaccessibility of metal(loid)s in first-tier screening. This affordable, single-extraction method is easy to use in analytical laboratories and is both fast and reproducible. For second-tier validation studies, the UBM protocol should be applied to a limited number of samples. With the new approach, the relative bioavailability can be directly calculated using an in vivo/in vitro equation in the stomach compartment, thus, enabling UBM validation. The results of the pilot study demonstrated that to refine exposure assessments, adjusting chronic daily intake using relative bioavailability data was more effective than were classical approaches based on total concentrations. This method offers a promising perspective for stakeholders in managing polluted sites and soils.

4.2.1. Introduction

Lead contamination in soils is a widespread environmental issue that has garnered significant attention because of its distribution in many soils and its detrimental effects on both ecosystems and human health. Originating from various anthropogenic activities as well as from the alteration of the parent rock, Pb persists in the environment and accumulates in soils over time. Lead is one of the most toxic metals in the environment, affecting almost every organ in the body, particularly the nervous system (central and peripheral), kidneys, and cardiovascular system (Ayangbenro et al., 2017; Flora et al., 2012). Children (6 months–6 years) are particularly vulnerable to Pb exposure because of their close contact with the environment (i.e., hand-to-mouth behavior, in particular), high ingested quantity to body weight ratio, and high gastrointestinal absorption (Glorennec et al., 2012; Hivert et al., 2002). Even low blood Pb levels in children can contribute to behavioral problems, learning deficits, and lowered intellectual quotient (Wani et al., 2015). For example, the environmental Pb exposure in children who have maximal blood Pb levels >7.5 μ g L⁻¹ can be associated with intellectual deficits (Lanphear et al., 2019).

Currently, the human health risk assessment (HHRA) is based on the total (or pseudototal) concentration of contaminants in the soil. However, this approach may overestimate the actual exposure because it fails to account for the absorption capacity of the human body and the interactions between soil compounds and contaminants. Only the bioavailable fraction can generate toxic effects and corresponds to the fraction of contaminants that reach the systemic circulation (Semple et al., 2004). However, the measurement of the bioavailable fraction requires animal experiments. Therefore, in vitro tests have been developed to simulate the solubilization phase, termed bioaccessibility (BAc), of contaminants in digestive fluids, which is considered the limiting phase of bioavailability. Although there is consensus on the importance of considering BAc when assessing exposure, its integration into risk calculations is often performed using proprietary approaches that lack adequate justification. A previous literature review (Billmann et al., 2023) revealed that most studies included BAc directly in the calculation of chronic daily intake (CDI), assuming that the relative bioavailability (RBA) was equal to BAc or substituting it for the total concentration. However, this practice does not always align with some proposed methodologies, particularly in the US and France. For instance, the US approach recommends using equations to estimate the RBA of As and Pb from the BAc obtained with Method 1340 (US EPA, 2017), whereas the French methodology suggests using an adjustment factor to use the BAc of As, Cd, and Pb from the unified BAc method (ISO 17924:2019) (InVS-Ineris, 2012). In particular, for Pb, based on conservative absorption (80%) and bioavailability (40%) data (RIVM, 2006; Ziegler et al., 1978) and the reference dose (3.6 10^{-3} mg kg⁻¹d⁻¹; WHO, 2011) selected at the time, the adjustment factor was 2 (i.e., RBA = 2

179

× BAc). In this case, the methodology limits the use of Pb BAc when it exceeds 50% and is therefore not operational in these cases. A review of French practices is essential for proposing a unified approach for incorporating BAc into exposure assessment and risk calculation.

The French National Methodology for Managing Polluted Sites and Soils (MTES, 2017) recommends the unified bioaccessibility method (UBM) as the reference method for BAc assessment of metal(loid)s through the ingestion of soil. The UBM has been validated against an *in vivo* model for As, Cd, and Pb (Denys et al., 2012). However, this method has drawbacks, including being time-consuming, costly, presence of very few competent laboratories, and requiring expertise. Recognizing the need for a simpler, faster, and more accessible test, Pelfrêne et al., (2020) developed a simplified test. The simplified HCl test was validated against the UBM for As, Cd, and Pb, and can be used as a proxy in preliminary studies to predict BAc. The HCl test is intended for screening purposes and provides a quick estimate of potential BAc across numerous soil samples without replacing the UBM test.

Particular attention should be paid to the preparation of soil samples. In the UBM protocol, the use of a soil sample sieved to <250 μ m, without mechanical milling, is recommended for BAc determination, as well as for total concentrations, particularly when BAc is expressed as a percentage. However, stakeholders (particularly laboratories and environmental consulting firms) may not properly follow this preparation procedure to determine the total concentrations. This is probably linked to established practices in the methodologies used by stakeholders. For initial pollution diagnostics without a BAc implementation target, the classic soil preparation procedure of the ISO 11464 standard (2006) is followed, which involves sieving the soil sample to 2 mm, and then milling it until the entire sample passes through a 250 µm sieve. Milling is a common practice in laboratories in the absence of any specific request to the contrary from the environmental consulting firm regarding the objectives of its study. The aim of this milling procedure was to improve the representativeness of the analysis and promote the solubilization of pollutants, regardless of the nature of the compartments in which they were found. However, when assessing exposure related to soil ingestion, it is crucial to measure the total or bioaccessible concentrations in the fractions that are most likely to be ingested. Using a coarse fraction and milling is not representative of the actual ingestion exposure, because only fine fractions are likely to adhere to the hands (Choate et al., 2006; Ruby & Lowney, 2012; US EPA, 2000; Yamamoto et al., 2006). Moreover, not using the finer fraction may lead to an overestimation or underestimation of the contaminant concentration in the risk fraction because it can vary among different soil fractions (Bergstrom et al., 2011; Gong et al., 2014).

The current study implemented a complete operational approach for Europe to measure the BAc and integrate it into the HHRA. Specifically, the aims of this study were to (i) illustrate the importance of

soil preparation methods to assess human exposure and their effect on the percentage BAC, (ii) provide relevant feedback on the use of the simplified HCl test for predicting UBM BAc, (iii) investigate the influence of soil physicochemical parameters, and (iv) evaluate the integration of Pb BAc in comparison to the total concentration in risk calculations. A case study was conducted in France, in particular in the Île-de-France region, including the City of Paris and its surrounding areas. This territory contains numerous Pb-contaminated sites and sometimes high background concentrations. This contamination is attributed to a combination of factors including a significant industrial past, sludge application during the 19th century, the Notre-Dame fire in 2019, and the use of leaded gasoline in vehicles (Barbillon et al., 2019; Belon et al., 2012; Briard et al., 2024). Through studying the Ile-de-France sites, we aimed to provide valuable information that will enable scientists to pursue research and for environmental and HHRA stakeholders to better use BAc when assessing the health risks associated with Pb soil contamination by highlighting focal points regarding soil matrix preparation, relevance of the use of the simplified test in preliminary BAc studies for screening purposes, and for the integration of BAc into the HHRA.

4.2.2. Materials and methods

4.2.2.1. Sampling sites

A total of 45 soil samples were collected in the Ile-de-France region in October 2022, primarily from public garden lawns, but also from urban wastelands, shared gardens, an orchard, and a wooded area (Figure 35). To minimize uncertainty regarding the representativeness of surface soil sampling, several sub-samples (5–10) were combined to produce a composite sample for analyses. In this pilot study, the horizon depth (0–30 cm) was selected as the default. In HHRA diagnostics, methodological guides recommend that the depths sampled are consistent with the conceptual scheme (exposure pathway, uses, and receptors).



Figure 35. Location of the 45 soil samples collected in the IIe-de-France region. ACH1-2: two soil samples in Achères

PAR1-8: eight soil samples in Montreuil; PAR9-39: 31 soil samples in Paris; SSD1-3: three soil samples in Saint-Denis; VIN1: one soil sample in Vincennes

4.2.2.2. Soil preparation protocols

The soil samples were dried at 40 °C, sieved at 2 mm (Sieve Shaker AS 200 Control; Retsch) and separated into two sub-samples (Figure 36).



Figure 36. Experimental design from soil preparation protocols to bioaccessibility and total concentration measurements, right through to risk calculations according to 5 scenarios

Standard preparation procedure for pollution diagnostics – In accordance with ISO 11464 (2006), one sub-sample was milled to pass through a 250 μ m sieve. In this study, this fraction is referred to as the "milled fraction" (Figure 36). Many stakeholders follow this standard preparation method. However, a recently updated French guide on diagnosis of polluted sites and soils (MTECT, 2023) states that for health risk assessment purposes, collected samples are recommended to be sieved at 250 μ m in the laboratory (without prior milling) before analysis, to obtain the fraction representative of exposure by ingestion.

Specific preparation procedure for human exposure assessment with BAc – Following the procedure described in ISO 17924:2019 to assess human exposure through BAc, a second sub-sample was sieved at 250 μm without mechanical milling. This fraction is referred to as the "sieved fraction" in this study (Figure 36).

4.2.2.3. Soil characterization

Soil pH was measured in water (NF ISO 10390) and organic matter content was determined by dry combustion (NF ISO 10694). The total carbonate content was determined by measuring the volume of CO₂ released after reaction with HCl (NF ISO 10693). Assimilable phosphorus, expressed as P_2O_5 , was cold extracted using NF X31161. Single extraction with a mixture of solutions (0.111 mol L⁻¹ sodium bicarbonate, 0.267 mol L⁻¹ sodium tricitrate, and 200 g L⁻¹ sodium dithionite) was performed to extract free Fe, Mn, and Al oxides (i.e., oxides not bonded to silicates) (Mehra and Jackson, 1960). The cation exchange capacity (NF ISO 11260) was determined after the extraction of exchangeable bases by saturation with a known amount of magnesium sulfate (0.02 mol L⁻¹) and by measuring the excess Mg. The pseudototal Pb concentrations were determined in both subsamples (milled and sieved fractions) and were obtained by aqua regia (4.5 mL HCl 37% + 2 mL HNO₃ 68%) digestion in a Hot Block and determined by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (Agilent). Mineralization of each soil sample was performed in triplicate, and blank and reference materials (NIST SMR2710a) were added to each series.

4.2.2.4. In vitro oral BAc measurement

Simplified HCl method as a proxy (Figure 36) – The HCl test was based on the method described by Pelfrêne et al., (2020). For this simplified test, 25 mL of a 0.65% (v/v) HCl solution was added to 0.03 g of sieved fraction (<250 μ m). The samples were placed in an ultrasonic bath for 15 min and then in a thermostatic chamber for 1 h at 37°C. The extract was filtered using 0.45 μ m cellulose acetate filters

before being stored in a refrigerator (4°C) until analysis by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (Agilent). Three replicates were performed for each sample. A reference (NIST SMR2710a) and a blank in each phase were added per series to verify the quality of the experiment. This simplified test aimed to predict the BAc in the gastric (G) and gastrointestinal (GI) phases from the concentrations extracted by the simplified HCl test (Pelfrêne et al., 2020) using Eq. 1 and Eq. 2.

$$log_{10}[Pb]_{BAC G} = 1.01 \times log_{10}[Pb]_{HCl} - 0.06; r^{2} = 0.99$$
(1)
$$log_{10}[Pb]_{BAC GI} = 1.11 \times log_{10}[Pb]_{HCl} - 1.28; r^{2} = 0.72$$
(2)

UBM test (Figure 36) – The UBM test was performed according to the ISO 17924:2019 standard. This physiological test simulates two digestive phases: G and GI. For the G phase extraction, 9 mL of saliva was added to 0.6 g of the sieved fraction (<250 μ m) followed by 13.5 mL of gastric juice. The solution pH was adjusted to 1.2 ± 0.05 with HCl (37%) before being shaken by rotation for 1 h at 37°C. The G phase extraction was stopped, and the pH was adjusted to below 1.5. Then, 27 mL duodenal juice, followed by 9 mL of bile juice, were added to the GI phase solution, before adjusting the pH to 6.3 ± 0.5 with NaOH (10 M). The solution was shaken by rotation for 4 h at 37°C. Both phases were centrifugated at 4500G for 5 min immediately after extraction. The supernatant was collected using a plastic dropper and acidified with HNO₃ before being stored in a refrigerator (4°C) until analysis by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (Agilent). Three replicates were performed for each sample. A reference (NIST SMR2710a) and a blank were added to each phase per series to check the quality of the extraction.

4.2.2.5. Human health risk assessment

Exposure and risk assessment (Figure 36) – The exposure to Pb, risk of threshold effects, and non-threshold effects were estimated by calculating the CDI (Eq. 3), hazard quotient (HQ; Eq. 4), and the carcinogenic risk (CR; Eq. 5).

$$CDI = \frac{C \times IngR \times EF \times ED}{BW \times AT} \times 10^{-6}$$
(3)
$$HQ = \frac{CDI}{RfD}$$
(4)
$$CR = CDI \times SF$$
(5)

where CDI is the chronic daily intake (mg Pb kg⁻¹ bw day⁻¹), C is the total concentration of Pb in soil (mg kg⁻¹), IngR is the ingestion rate of soil (mg day⁻¹), EF is the exposure frequency (days year⁻¹), ED is the exposure duration (years), 10^{-6} corresponds to the conversion (kg mg⁻¹) factor (unitless), BW is the body weight (kg), AT is the averaging time (days), HQ is the hazard quotient (unitless), RfD is the reference dose for threshold effects (0.63 µg kg⁻¹d⁻¹; ANSES, 2013; Efsa, 2010), CR is the cancer risk

(unitless), and SF is the slope factor for non-threshold effects (8.5 (μ g kg⁻¹d⁻¹)⁻¹; OEHHA, 2009). Risk was categorized as acceptable when the HQ was <1 and the CR was <10⁻⁵. These values are generally accepted by health organizations.

In the first approach (**Approach 1**), HQ and CR were calculated based on the pseudototal soil Pb concentration and are presented in the Supplementary Material (SM3). As no CR value exceeded the 10^{-5} threshold, taking them into account will not influence the risk acceptability of the soils. Therefore, only the HQs are presented in this study.

In this study of sites in the IIe-de-France region, HHRA was conducted for Pb according to five exposure scenarios: urban farmer (adult), public garden (adult/child), and resident (adult/child), based on the specific parameter values selected for this study (Table 32).

 Table 32. Definitions of the parameters for human health risk assessments for the five exposure scenarios

Daramatar	Definition	Definition Farmer Public garden		garden	Resident					
Parameter	Definition	Adult	Adult	Child	Adult	Child				
IngR (mg d ⁻¹)	Ingestion rate	200	50	91	50	91				
EF (d y ⁻¹)	Exposure frequency	220	156	156	365	365				
ED (y)	Duration of exposure	42	64	6	30	6				
BW (kg bw ⁻¹)	Body weight	70	70	15	70	15				
	Averaging time:	Averaging time: For substance with threshold effects: AT (d) = ED ×								
AT (d)	period over which	period over which 365 (d); For substance with non-threshold effects: AT								
	exposure is averaged	(d)= 70 × 36	65 (d) (ove	r a lifetime).					

Sources: MTES, 2017; Ineris, 2017; French labor code

New approach based on *in vivo/in vitro* equations (Approach 2) – In this approach, the RBA was integrated into the CDI calculation (Eq. 6).

$$CDI = \frac{C \times IngR \times EF \times ED \times RBA}{BW \times AT} \times 10^{-6}$$
 (6)

Total Pb concentration was determined from the sieved fraction (without milling). More specifically, the RBA was predicted from the BAc of UBM using regression models established in *in vivo* assays to validate the *in vitro* test (Denys et al., 2012). The currently preferred models for predicting RBA from the relative BAc (RBAc) for Pb in both the G and GI phases are described below (Eq. 7 and 8):

$$RBA (\%) = 0.91 \times RBAc \ G (\%) - 1.69$$
(7)
$$RBA (\%) = 0.92 \times RBAc \ GI (\%) - 1$$
(8)

where RBAc of Pb corresponds to the ratio of the absolute BAc of Pb in soil to the absolute BAc of Pb in the reference form (i.e., Pb acetate) used for *in vivo* assays. The absolute BAc of Pb acetate was 99 \pm 2% and 65 \pm 3% in the G and G1 phases, respectively (Denys et al., 2012). In a study by Denys et al., (2012), very good correlations were obtained between RBA and RBAc in the G (R^2 = 0.93) and GI (R^2 = 0.89) phases. However, the authors suggested that the "stomach" compartment alone is a better

analog of *in vivo* bioavailability. In the new approach proposed in the current study, the RBA was predicted only from the BAc in the G phase measured in the soil sample and in the reference form (Eq. 9):

$$RBA (\%) = 0.91 \times \frac{BAc \, G_{soil}(\%)}{0.99} - 1.69 \tag{9}$$

Previously recommended approach (Approach 3) – The third approach used the French methodology recommended till recently (InVS-Ineris, 2012), and which was used until the publication of a new national guide. This approach is described in detail by Billmann et al., (2023). Briefly, the higher BAc value from UBM should be considered (i.e., G phase in most cases), but also those with the best *in vivo/in vitro* correlation (i.e., G phase), and an adjustment factor of 2 should be applied to calculate RBA (i.e., RBA = BAc G × 2 in Eq. 6).

The five examined scenarios (Table 32) were tested using the three CDI adjustment methods (Approaches 1–3).

4.2.2.6. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using XLSTAT 2022.1.1 (Addinsoft). Spearman's correlation was used to study the influence of the soil parameters on BAc, and correlations were considered significant at a 0.05 level. The Spearman's non-parametric test was used to evaluate the effect of one quantitative variable on another, and to detect trends of any form. This test verified whether the two variables were related. The dependent samples *t*-test was used to compare the sample means of the total Pb concentration, depending on the soil sample preparation. The Shapiro–Wilk test was used to check for normality of the samples.

4.2.3. Results and discussion

4.2.3.1. Soil properties

The physicochemical characteristics of the soil samples are listed in Table 33. Depending on the sample preparation (sieved or milled), total Pb was between 57 and 839 mg kg⁻¹ (mean 242 mg kg⁻¹) for the sieved fractions and between 48 and 719 mg kg⁻¹ (mean 209 mg kg⁻¹) for the milled fractions. The 45 soil samples from the IIe-de-France region covered a wide range of values in terms of CaCO₃ (137 g kg⁻¹ ± 83), P₂O₅ (0.7 g kg⁻¹ ± 0.5), and Fe oxides (7.1 g kg⁻¹ ± 3.4). In contrast, soil pH (7.9 ± 0.3), OM (10% ± 3.4), cation exchange capacity (29 cmol⁺ kg⁻¹ ± 9), and Mn oxides (223.4 mg kg⁻¹ ± 75) were relatively similar.

Poforonco	Sigurad	Millod		CaCO₃	мо	P O	Fe	Mn	Al	050
Reference	Sieveu	willeu	рп	CaCO3	WIU	P2U5	oxide	oxide	oxide	LEC
	mg kg⁻¹	mg kg⁻¹		g kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	mg kg⁻¹	mg kg ⁻¹	mg kg ⁻¹	cmol+ kg⁻¹
ACH1	160	136	8.0	36	3	761	7156	398	1342	10
ACH2	289	182	7.8	59	5	1222	6083	194	776	15
PAR1	164	137	7.9	213	6	252	5569	243	978	26
PAR2	159	136	7.9	31	12	383	5087	269	1022	28
PAR3	74	68	7.9	66	10	405	5954	178	1177	21
PAR4	138	131	7.8	46	13	142	5376	169	1048	35
PAR5	135	133	7.4	62	16	1732	5925	401	1221	40
PAR6	232	177	7.3	206	16	1317	6944	408	1036	32
PAR7	396	719	7.8	272	13	203	6686	133	1421	23
PAR8	324	597	7.6	151	14	1232	5645	107	1126	40
PAR9	839	581	7.5	196	15	2439	27735	392	3665	45
PAR10	199	151	7.9	121	9	728	4645	108	1400	31
PAR11	274	244	7.9	63	10	832	6388	195	939	27
PAR12	227	206	8.0	150	12	668	7152	269	1348	39
PAR13	309	263	8.0	140	13	969	6574	303	1951	31
PAR14	211	215	8.0	91	11	684	6004	265	1774	34
PAR15	187	150	8.1	130	9	683	5120	265	1865	26
PAR16	197	196	8.1	103	7	795	5603	230	1595	34
PAR17	269	229	8.0	179	9	713	5332	151	1601	37
PAR18	273	213	8.0	192	11	805	6615	117	1636	38
PAR19	240	177	7.8	147	11	874	6336	260	1585	41
PAR20	299	192	7.7	144	13	1541	6087	232	1502	36
PAR21	249	210	7.6	109	13	1505	7377	240	1666	31
PAR22	252	208	7.9	153	10	968	7711	145	2220	40
PAR23	577	444	7.9	104	14	785	6298	229	1983	23
PAR24	94	105	8.0	71	5	523	7991	233	1816	23
PAR25	84	89	8.0	37	5	547	7108	188	2018	26
PAR26	118	114	8.1	109	7	556	7026	240	1877	35
PAR27	346	318	7.9	192	11	893	7026	198	2123	38
PAR28	467	341	7.9	106	13	734	5840	236	2210	34
PAR29	197	173	8.0	95	13	643	10787	150	1960	40
PAR30	105	106	7.9	409	16	308	9930	249	1717	23
PAR31	60	48	8.3	134	5	155	6620	223	1732	29
PAR32	92	94	7.8	51	8	672	6818	214	1890	26
PAR33	58	52	8.0	43	7	339	8011	233	1948	27
PAR34	185	151	7.9	170	9	647	7237	270	2173	23
PAR35	444	320	8.1	76	8	607	6275	210	2011	23
PAR36	86	72	8.1	36	6	334	7654	196	1967	23
PAR37	106	94	8.3	196	6	422	7039	228	1383	20
PAR38	548	393	8.0	147	11	1266	6507	175	1171	35
PAR39	161	143	8.0	335	10	785	8027	231	1259	30
SSD1	780	475	7.8	162	14	315	7795	231	1287	31
SSD2	106	52	8.6	239	7	123	7036	116	830	9
SSD3	57	55	7.9	300	7	384	3251	88	939	18
VIN1	126	97	6.8	100	6	67	7457	244	1268	9

Table 33. Physico-chemical characteristics of the soil samples studied (n = 45)

n = 45; Sieved: total Pb concentration measured in sieved soil sample (<250 μ m); Milled: total Pb concentration measured in <2 mm soil sample milled to <250 μ m

OM, organic matter content; CaCO₃, total carbonates; P₂O₅: assimilable phosphorus; CEC: cation exchange capacity; ACH1-2: Achères; PAR1-8: Montreuil; PAR9-39: Paris; SSD1-3: Saint-Denis; VIN1: Vincennes

4.2.3.2. Assessment of Pb BAc by the simplified method as a screening tool

First, a simplified test was conducted on the 45 soil samples using HCl. For these samples, HClextracted Pb concentrations varied from 41 to 659 mg kg⁻¹ (average 229 mg kg⁻¹) (Figure 37). These values were corrected using the equations established by Pelfrêne et al., (2020) (Eq. 1 and 2) to predict the bioaccessible concentrations in the G and GI phases, which are classically assessed using the UBM test. After calculation, predicted bioaccessible concentrations ranged from 38 to 619 mg kg⁻¹ (average 213 mg kg⁻¹) in the G phase and from 3 to 69 mg kg⁻¹ (average 22 mg kg⁻¹) in the GI phase (Figure 3). Second, the bioaccessible concentrations of Pb were measured using the UBM in both the G and GI phases. For the 45 soil samples, the BAc concentrations varied from 29 to 460 mg kg⁻¹ (average 144 mg kg⁻¹) in the G phase and from 8 to 180 mg kg⁻¹ (average 53 mg kg⁻¹) in the GI phase (Figure 3).





[Pb]_{UBM-G} and _{UBM-GI}, measured bioaccessible concentrations in both the G and GI phases, respectively, using UBM; the red cross represents the mean calculated across the sites.

Expressed in relation to pseudototal concentrations, predicted percentages of bioaccessible Pb ranged from 36% to 100% in the G phase (mean 87%) and from 3% to 14% in the GI phase (mean 9%), whereas measured percentages of bioaccessible Pb ranged from 27% to 92% in the G phase (mean 61%) and from 6% to 44% in the GI phase (mean 22%) (Table 34).

 BAc	Min	Q25	Mean	Median	Q75	Max							
 Predicted G	36	79	87	91	99	100							
Predicted GI	3	8	9	9	10	14							
Measured G	27	56	61	61	67	92							
Measured GI	6	17	22	23	27	44							

Table 34. Summary statistics for predicted Pb bioaccessibility (BAc) based on HCl extraction and Pb BAc measured using UBM in the gastric (G) and gastrointestinal (GI) phases (expressed as % of pseudototal concentrations)

A comparison between the predicted and measured Pb BAc values showed that the simplified HCl test tended to overestimate BAc, which is not in agreement with the results reported by Pelfrêne et al., (2010). In this previous study, equations were established from 208 soil samples, which were collected nationwide and presented wide diversity in terms of physicochemical parameters and degrees of Pb, As, and Cd contamination. It is speculated that for the sites in the Ile-de-France case study, in which the soil samples came from a geographically close area with a similar historical context, the BAc may behave similarly and, in this case, overestimate Pb BAc in the G phase. However, this observation remains reassuring, as it is more protective. The prediction was slightly lower in the GI phase but was consistent with the findings of Pelfrêne et al., (2020). This indicates that the HCl test was better for predicting BAc in the G phase than in the GI phase. This may be explained by the fact that the G phase was an HCl-acidified phase and therefore very similar to the HCl test, whereas in the GI phase, the pH was close to neutral, which favors Pb re-precipitation. For cost-reduction purposes and to obtain an initial estimate of the BAc, the simplified test remains a very useful proxy for determining the BAc and reducing the number of samples to be considered for the UBM test in the second approach for HHRA.

4.2.3.3. Influence of physico-chemical properties of soils on BAc

Spearman correlations were determined to study the influence of the soil matrix on Pb BAc, measured using the UBM test, to better understand the mechanisms governing BAc (Table 35). Apart from a weak correlation with carbonate (CaCO₃, r = -0.40) content, no link could be established. This may be owing to the low variability in physico-chemical parameters, particularly of key parameters controlling the availability of metallic elements, such as soil pH (Basta et al., 1993; Billmann et al., 2023; Du et al., 2020; Kierulf et al., 2022; Lake et al., 2021). This may be because of the close geographical location of these sites, as well as their predominant public garden setting, which limits sample diversity.

Variables	BAc G% Pb	BAc GI% Pb
рН	-0.12	-0.09
CaCO₃ g kg ⁻¹	0.08	-0.40
OM %	-0.09	-0.02
P ₂ O ₅ g kg ⁻¹	-0.05	0.04
Fe oxide g kg ^{−1}	-0.07	-0.15
Mn oxide mg kg ⁻¹	-0.06	-0.20
Al oxide mg kg ⁻¹	0.05	0.07
CEC cmol ⁺ kg ⁻¹	0.15	0.02

Tableau 35. Spearman correlation between soil parameters and Pb bioaccessibility

Spearman's correlation values in bold are significant at the 0.05 level. OM, organic matter; P₂O₅, assimilable phosphorus; CEC, cation exchange capacity; BAc, bioaccessibility; G, gastric phase; GI, gastrointestinal phase

4.2.3.4. Influence of soil sample preparation on oral BAc of Pb

Total Pb concentration was measured in two differently prepared soil fractions (sieved and milled; Table 33). The results of total concentration for each soil type depending on the soil preparation method are shown in Figure 38. A t-test was performed to assess significant differences (p < 0.05). The results highlighted that (i) Pb concentrations were significantly higher after sieving in 58% of cases (26 soils) than in milled soil samples; (ii) in 40% of cases (18 soils), no significant differences were observed between sieved and milled samples; and (iii) Pb concentrations were significantly higher after milling in only 2% of cases (only 1 soil). Depending on the texture of the soil (i.e., its composition in terms of coarse or fine particles), the milling process may dilute contamination, as increased contaminants tend to be found in the fine fractions (Goix et al., 2016; Ma et al., 2019). These observations are consistent with those of Ikegami et al., (2014), where total Pb concentrations were higher in the <105 μ m fraction than in the <2 mm fraction and the findings of Metha et al., (2020), wherein the total concentrations of metals for the <250 μ m fraction were considerably higher than for the <2 mm fraction. Lead concentrations increased with decreasing soil particle size, which can be explained by the greater exchange surface of the fine fraction (small particles) than that of the coarse fraction (large particles). As the <250 μ m fraction is the most likely to adhere to hands and be accidentally ingested (US EPA, 2000; Yamamoto et al., 2006), the use of the milled fraction is not representative of the exposure fraction and could possibly lead to a wrong estimation of the soil ingestion exposure.



Figure 38. Differences between total Pb concentrations depending on the soil sample preparation method (sieved or milled); * indicates a significant difference (Student's t-test; p < 0.05)

In approximately half of the soil samples, milling the sample resulted in a lower Pb concentration than that of the sieved samples. Bioaccessibility is often expressed as a percentage of the total concentration. Polluted soil stakeholders use the total concentrations measured in milled samples because they are used to measuring the total concentrations following ISO 11464 (2006). Some researchers have measured the total concentrations using an X-ray fluorescence analyzer on coarser soil fractions (Cocerva er al., 2024; Cox et al., 2017; Metha et al., 2020). This practice raises the question of the effect of using a different fraction on the calculated percentage of BAc.

Bioaccessibility, expressed as a percentage, is the ratio of bioaccessible Pb to total Pb. Figure 39 shows the Pb BAc percentage distribution in the G and GI phases depending on the use of sieved or milled total Pb concentrations and includes a table summarizing the number of soil samples for which the BAc percentages were significantly different, as analyzed using the Student's *t*-test (p < 0.05). With the sieving procedure, the BAc percentages were between 32% and 75% (average 59%) in the G phase and between 6% and 37% (average 21%) in the GI phase, whereas with the milling procedure, the values were between 32% and 99% (average 73%) in the G phase and between 8% and 47% (average 26%) in the GI phase. The results highlighted that (i) Pb BAc percentages were significantly higher after milling in 64% and 62% of cases in the G and GI phases, respectively, than after sieving; (ii) significant differences were absent in 36% and 38% of cases in the G and GI phases, respectively. Overall, for these IIe-de-France sites, the use of total concentrations measured in the milled fraction when calculating the percentage of bioaccessible Pb tended to overestimate BAc compared to the sieved method prescribed by the UBM. Comparing two different fractions is of little

relevance insofar as the sieved fraction corresponds to a fraction of the 2 mm sample from which the >250 μ m particles have been removed. Therefore, comparing two measurements made on different fractions may result in the comparison of two different samples, as there is no guarantee that the distribution of contaminants is homogeneous. Moreover, this contradicts the main purpose of using BAc, which is to refine the assessment of human exposure linked to soil ingestion.



Figure 39. Bioaccessibility percentages of Pb depending on the soil sample preparation method for total concentration measurements (sieved or milled) and statistical analysis of the differences (Student's t-test; p < 0.05)

4.2.3.4. Application of RBA in human health risk assessment

In this study, HHRA was conducted across five scenarios (Table 32) using three approaches for HQ calculations: Approach 1: total concentrations (RBA = 1); Approach 2: the new approach based on RBA calculation using the *in vivo/in vitro* equation in the G phase; Approach 3: the previously recommended methodology, which considers the G phase and an adjustment factor of 2 (RBA = BAc G × 2) (Table 1). The aim of this pilot study was to demonstrate that accounting for BAc can lead to a more realistic health risk assessment. The main comparison was between the classic total concentration approach (Approach 1) and the proposed new approach (Approach 2) while respecting good practices in terms of sample preparation (sieving and not milling). A comparison of the results of the classic approach with those of the previously recommended method (Approach 3; InVS-Ineris, 2012), which remains the method currently used, was also performed for information purposes. The HQs of all soil samples were calculated for all scenarios and adults and children, regardless of the initial soil use (Table 36), and a summary of the number of soils with acceptable or unacceptable risk is shown in Figure 40. It is important to keep in mind that in real cases of risk assessment, the use of the site should be considered when deciding whether the risk is acceptable. The risk was categorized as acceptable when the HQ was <1 for each receptor.

Soil	[Pb]tot	Fa	rmer (Ad	ult)	Public	garden ((Adult)	Public	garden	(Child)	Res	ident (Ac	lult)	Res	sident (Cl	nild)
	(mg kg ⁻¹)	A1	A2	A3	A1	A2	A3	A1	A2	A3	A1	A2	A3	A1	A2	A3
ACH1	160	0.4	0.2	0.5	0.1	0.0	0.1	0.7	0.4	0.8	0.2	0.1	0.2	1.5	0.8	1.9
ACH2	289	0.8	0.4	1.0	0.1	0.1	0.2	1.2	0.6	1.4	0.3	0.2	0.4	2.8	1.5	3.4
PAR1	164	0.5	0.3	0.7	0.1	0.1	0.1	0.7	0.5	1.0	0.2	0.1	0.3	1.6	1.1	2.4
PAR2	159	0.4	0.2	0.5	0.1	0.0	0.1	0.7	0.3	0.7	0.2	0.1	0.2	1.5	0.8	1.7
PAR3	74	0.2	0.1	0.2	0.0	0.0	0.0	0.3	0.2	0.4	0.1	0.0	0.1	0.7	0.4	0.8
PAR4	138	0.4	0.2	0.4	0.1	0.0	0.1	0.6	0.3	0.6	0.2	0.1	0.2	1.3	0.7	1.5
PAR5	135	0.4	0.2	0.4	0.1	0.0	0.1	0.6	0.3	0.6	0.2	0.1	0.2	1.3	0.7	1.5
PAR6	232	0.6	0.3	0.7	0.1	0.1	0.1	1.0	0.5	1.0	0.3	0.1	0.3	2.2	1.1	2.4
PAR7	396	1.1	0.5	1.2	0.2	0.1	0.2	1.6	0.8	1.8	0.5	0.2	0.5	3.8	1.9	4.3
PAR8	324	0.9	0.7	1.6	0.2	0.1	0.3	1.3	1.1	2.5	0.4	0.3	0.7	3.1	2.6	5.7
PAR9	839	2.3	1.1	2.4	0.4	0.2	0.4	3.5	1.6	3.6	1.0	0.4	1.0	8.1	3.7	8.4
PAR10	199	0.5	0.3	0.8	0.1	0.1	0.1	0.8	0.5	1.2	0.2	0.1	0.3	1.9	1.2	2.7
PAR11	274	0.8	0.4	1.0	0.1	0.1	0.2	1.1	0.7	1.5	0.3	0.2	0.4	2.6	1.6	3.5
PAR12	227	0.6	0.3	0.6	0.1	0.1	0.1	0.9	0.4	0.9	0.3	0.1	0.3	2.2	0.9	2.1
PAR13	309	0.8	0.5	1.1	0.2	0.1	0.2	1.3	0.7	1.6	0.4	0.2	0.4	3.0	1.7	3.8
PAR14	211	0.6	0.3	0.7	0.1	0.1	0.1	0.9	0.5	1.0	0.2	0.1	0.3	2.0	1.1	2.4
PAR15	187	0.5	0.3	0.6	0.1	0.1	0.1	0.8	0.4	0.9	0.2	0.1	0.3	1.8	0.9	2.1
PAR16	197	0.5	0.3	0.7	0.1	0.1	0.1	0.8	0.5	1.0	0.2	0.1	0.3	1.9	1.1	2.4
PAR17	269	0.7	0.4	1.0	0.1	0.1	0.2	1.1	0.7	1.5	0.3	0.2	0.4	2.6	1.5	3.4
PAR18	273	0.8	0.5	1.0	0.1	0.1	0.2	1.1	0.7	1.6	0.3	0.2	0.4	2.6	1.6	3.6
PAR19	240	0.7	0.4	0.8	0.1	0.1	0.2	1.0	0.6	1.2	0.3	0.2	0.3	2.3	1.3	2.9
PAR20	299	0.8	0.5	1.0	0.1	0.1	0.2	1.2	0.7	1.6	0.3	0.2	0.4	2.9	1.6	3.7
PAR21	249	0.7	0.3	0.7	0.1	0.1	0.1	1.0	0.5	1.1	0.3	0.1	0.3	2.4	1.1	2.5
PAR22	252	0.7	0.3	0.7	0.1	0.1	0.1	1.0	0.5	1.1	0.3	0.1	0.3	2.4	1.1	2.5
PAR23	577	1.6	0.7	1.7	0.3	0.1	0.3	2.4	1.1	2.5	0.7	0.3	0.7	5.6	2.6	5.8
PAR24	94	0.3	0.2	0.4	0.1	0.0	0.1	0.4	0.2	0.5	0.1	0.1	0.2	0.9	0.6	1.3
PAR25	84	0.2	0.2	0.3	0.0	0.0	0.1	0.4	0.2	0.5	0.1	0.1	0.1	0.8	0.5	1.2
PAR26	118	0.3	0.2	0.4	0.1	0.0	0.1	0.5	0.3	0.6	0.1	0.1	0.2	1.1	0.6	1.4
PAR27	346	1.0	0.6	1.4	0.2	0.1	0.3	1.4	1.0	2.1	0.4	0.3	0.6	3.3	2.2	5.0
PAR28	467	1.3	0.7	1.6	0.2	0.1	0.3	1.9	1.1	2.4	0.5	0.3	0.7	4.5	2.5	5.6
PAR29	197	0.5	0.3	0.7	0.1	0.1	0.1	0.8	0.5	1.1	0.2	0.1	0.3	1.9	1.2	2.6
PAR30	105	0.3	0.2	0.4	0.1	0.0	0.1	0.4	0.3	0.6	0.1	0.1	0.2	1.0	0.7	1.5
PAR31	60	0.2	0.1	0.2	0.0	0.0	0.0	0.3	0.1	0.3	0.1	0.0	0.1	0.6	0.3	0.7

 Table 36. Hazard quotient (HQ) based on five scenarios according to three methodologies

PAR32	92	0.3	0.1	0.3	0.0	0.0	0.1	0.4	0.2	0.5	0.1	0.1	0.1	0.9	0.5	1.1
PAR33	58	0.2	0.1	0.2	0.0	0.0	0.0	0.2	0.1	0.3	0.1	0.0	0.1	0.6	0.3	0.7
PAR34	185	0.5	0.3	0.7	0.1	0.1	0.1	0.8	0.5	1.1	0.2	0.1	0.3	1.8	1.2	2.6
PAR35	444	1.2	0.3	0.7	0.2	0.1	0.1	1.8	0.5	1.1	0.5	0.1	0.3	4.3	1.1	2.6
PAR36	86	0.2	0.1	0.3	0.0	0.0	0.1	0.4	0.2	0.5	0.1	0.1	0.1	0.8	0.5	1.1
PAR37	106	0.3	0.2	0.4	0.1	0.0	0.1	0.4	0.3	0.6	0.1	0.1	0.2	1.0	0.6	1.4
PAR38	548	1.5	0.7	1.5	0.3	0.1	0.3	2.3	1.0	2.3	0.6	0.3	0.6	5.3	2.4	5.4
PAR39	161	0.4	0.3	0.6	0.1	0.1	0.1	0.7	0.4	0.9	0.2	0.1	0.3	1.6	1.0	2.2
SSD1	780	2.1	1.1	2.5	0.4	0.2	0.5	3.2	1.7	3.8	0.9	0.5	1.0	7.5	4.0	8.9
SSD2	106	0.3	0.1	0.2	0.1	0.0	0.0	0.4	0.1	0.2	0.1	0.0	0.1	1.0	0.2	0.6
SSD3	57	0.2	0.1	0.2	0.0	0.0	0.0	0.2	0.1	0.2	0.1	0.0	0.1	0.6	0.3	0.6
VIN1	126	0.4	0.2	0.4	0.1	0.0	0.1	0.5	0.3	0.6	0.1	0.1	0.2	1.2	0.6	1.4

A1: Approach 1, using total concentrations, (RBA = 1); A2: Approach 2, the new approach based on RBA calculation using the *in vivo/in vitro* equation in the gastric (G) phase; A3: Approach 3, the previously recommended methodology (InVS-Ineris, 2012) considering the G phase and an adjustment factor of 2 (RBA = BAc G × 2). ACH1-2: Achères; PAR1-8: Montreuil; PAR9-39: Paris; SSD1-3: Saint-Denis; VIN1: Vincennes

Results for the HQ showed that in both public garden and residential space scenarios, for adults, the risk was acceptable when considering the classical approach with total concentrations (Approach 1), regardless of the exposure parameters chosen, except for PAR9 and SSD1, where HQ was equal to or close to 1. When considering the new approach (Approach 2), the HQs were reduced. However, including RBA in these scenarios did not add value. For adults exposed to soil through their work, such as farmers, the risk was unacceptable (HQ>1) in 15% of the soils (seven soils) using Approach 1. This approach leads to an acceptable risk for the PAR7, PAR23, PAR28, PAR35 and PAR38 soils, where total Pb concentrations ranged from 396 to 577 mg kg⁻¹ and HQs ranged from 1.1 to 2.3. The exposure estimated using Approach 2 reduced the HQ to less than 1 for five of the seven soils compared with the HQs obtained using total concentration. After adjusting the CDI using the RBA G approach, the HQs of the soils ranged from 0.3 to 1.1.

For the scenario of children in an urban park, Approach 1 classified 19 soils as having an unacceptable risk with total concentrations varying between 249 and 839 mg kg⁻¹ and HQs between 1.0 and 3.5. The exposure estimated using the RBA G adjustment approach (Approach 2) reduced the HQs to less than 1 for 12 of the 19 soils compared with the use of the total concentrations. For these soils, the total Pb concentrations ranged from 249 to 444 mg kg⁻¹ and HQs from 1.0 to 1.8. Using this approach, the HQs fell below 1 in these soils and ranged from 0.5 to 0.9.

For the scenario of children in residential spaces, with Approach 1, 37 soils were classified as having unacceptable risk whereas 25 soils with Approach 2 by considering the RBA G adjustment. The RBA G approach enables refining exposure and thus reduced HQs below 1 in soils with Pb concentrations ranging from 106 to 227 mg kg⁻¹, for which HQs ranged from 1.0 to 1.8 when using the total concentration, whereas from 0.2 to 0.9 with Approach 2.

In this pilot study, the previously recommended methodology (Approach 3) was compared to the classical approach (Approach 1) (Table 36). For the different scenarios, the use of both the adjustment factor of 2 and the BAc value in the G phase resulted in a higher number of soils identified as having an unacceptable risk than with using the total concentrations. For example, by considering the scenario of farmers, for PAR8, the HQ based on total concentration was 0.9, whereas the HQ based on the adjustment by factor 2 method was 1.6 owing to 73% Pb BAc in the G phase. In contrast, for PAR35, the HQ based on the total concentration was 1.2, whereas that based on the adjustment by factor 2 approach was 0.7. This case was one of the only three in the entire study where this approach reduced the HQ compared with that calculated using the total concentration. This can be explained by the 30% Pb BAc in the G phase, which was the lowest in the study, combined with a total concentration of 444 mg kg⁻¹. This demonstrates the restrictive aspect of this approach for refining exposure; it only allows the refinement of exposure if the BAc is very low. As Pb BAc tends to be widely

distributed (Billmann et al., 2023) in the G phase, this approach can only be used minimally to refine exposure to Pb.



Figure 40. Number of soils for which the risk is acceptable (green) (HQ < 1) or unacceptable (red) (HQ > 1) according to the three approaches

Approach 1: using total concentrations (RBA = 1); Approach 2: the new approach based on RBA calculation using the *in vivo/in vitro* equation in the gastric (G) phase; Approach 3, the previously recommended methodology (InVS-Ineris, 2012) considering the G phase and an adjustment factor of 2 (RBA = BAc G \times 2).

Approach 3 produced a greater number of soil samples with unacceptable risk than Approach 1 without RBA adjustment, which contradicts the purpose of refining the exposure assessment. This study illustrates the limitations of this approach and the need for a new approach for stakeholders.

Approach 2 permits a better risk assessment via better estimation of exposure using the *in vitro/in vivo* equation in only the stomach. This approach can be set up in parallel with the US EPA (2021) methodology, which proposes a similar approach based on the integration of the absolute BAc in the G phase into the equations established using Method 1340 to determine the RBA, which is then used to adjust the CDI. Although this test is widely used globally, some studies have shown that it does not always result in the best *in vitro/in vivo* correlations (Li et al., 2019). Therefore, in France and Europe, the UBM test is used as a reference test.

4.2.4. Conclusion

This study proposes a comprehensive operational approach that incorporates BAc to refine human exposure and risk assessments. Based on a pilot study conducted in and around Paris, this approach

focused on assessing the BAc of metal(loid)s in cases of soil ingestion and integrating BAc into HHRA. These results highlight the importance of carefully following soil preparation protocols, particularly ISO 17924, when assessing population exposure. Specifically, sieving the soil to 250 μ m without mechanical milling is recommended for determining both bioaccessible and total concentrations. A simplified test using HCl can be employed to assess the BAc of metal(loid)s, at least in the first-tier screening. This more affordable single-extraction method is easy to use in analytical laboratories and is fast and reproducible. In this study, the HCl-extractable concentrations of Pb were used to calculate the predicted BAc using the equations previously established in France. For second-tier studies and complementary validation, the UBM protocol should be used with a limited number of soil samples for a better assessment of human exposure.

Regarding the integration of BAc into HHRA, the current approach is based on the guidelines of InVS-Ineris (2012), which allows the use of Pb BAc measured in the G phase of the UBM test, with the value corrected by a factor of two to estimate the RBA. In many cases, Pb BAc in the G phase exceeded 50%, making its inclusion in the CDI adjustment irrelevant. The new approach involves directly calculating the RBA from the *in vivo/in vitro* equation in the stomach compartment, which allows for UBM validation. The results from this pilot study using 45 soil samples demonstrated that adjusting CDI using RBA data may be more effective for refining exposure assessment than the classical approach based on total concentrations (i.e., assuming an RBA of 1) as well as the previously recommended approach. This new method offers a promising perspective for facilitating the use of Pb BAc data by stakeholders involved in polluted sites and soils.

4.2.5. References

Anses. (2013). Opinion of the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (2011-SA-0219). French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety.

Ayangbenro, A. S., & Babalola, O. O. (2017). A New Strategy for Heavy Metal Polluted Environments : A Review of Microbial Biosorbents. International Journal of Environmental Research and Public Health, 14, 94. https://doi.org/10.3390/ijerph14010094

Ayrault, S., Roy-Barman, M., Le Cloarec, M.-F., Priadi, C. R., Bonté, P., & Göpel, C. (2012). Lead contamination of the Seine River, France : Geochemical implications of a historical perspective. Chemosphere, 87, 902-910. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.01.043

Barbillon, A., Aubry, C., Nold, F., Besancon, S., & Manouchehri, N. (2019). Health Risks Assessment in Three Urban Farms of Paris Region for Different Scenarios of Urban Agricultural Users : A Case of Soil Trace Metals Contamination. Agricultural Sciences, 10, 352-370. <u>https://doi.org/10.4236/as.2019.103029</u>

Basta, N. T., Pantone, D. J., & Tabatabai, M. A. (1993). Path Analysis of Heavy Metal Adsorption by Soil. Agronomy Journal, 85, 1054-1057. <u>https://doi.org/10.2134/agronj1993.00021962008500050018x</u>

Belon, E., Boisson, M., Deportes, I. Z., Eglin, T. K., Feix, I., Bispo, A. O., Galsomies, L., Leblond, S., & Guellier, C. R. (2012). An inventory of trace elements inputs to French agricultural soils. Science of The Total Environment, 439, 87-95. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.09.011</u>

Bergstrom, C., Shirai, J., & Kissel, J. (2011). Particle size distributions, size concentration relationships, and adherence to hands of selected geologic media derived from mining, smelting, and quarrying activities. Science of The Total Environment, 409, 4247-4256. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.06.005</u>

Billmann, M., Hulot, C., Pauget, B., Badreddine, R., Papin, A., & Pelfrêne, A. (2023). Oral bioaccessibility of PTEs in soils : A review of data, influencing factors and application in human health risk assessment. Science of The Total Environment, 896, 165263. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165263</u>

Briard, J., Ayrault, S., Baron, S., Bordier, L., Roy-Barman, M., Syvilay, D., Azéma, A., & L'Héritier, M. (2024). Historical monuments and lead pollution : Lessons from the case of Notre-Dame de Paris and Sainte-Chapelle. Journal of Cultural Heritage, 65, 99-106. <u>https://doi.org/10.1016/j.culher.2023.04.010</u>

Choate, L. M., Ranville, J. F., Bunge, A. L., & Macalady, D. L. (2006). Dermally adhered soil : 1. Amount and particle-size distribution: Dermally Adhered Soil: Amount and Size. Integrated Environmental Assessment and Management, 2, 375-384. <u>https://doi.org/10.1002/ieam.5630020409</u>

Cocerva, T., Robb, M., Wong, A., Doherty, R., Newell, J., Ofterdinger, U., Carey, M., Cave, M., & Cox, S. F. (2024). Using oral bioaccessibility measurements to refine risk assessment of potentially toxic elements in topsoils across an urban area. Ecotoxicology and Environmental Safety, 276, 116293. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.116293

Cox, S. F., Rollinson, G., & McKinley, J. M. (2017). Mineralogical characterisation to improve understanding of oral bioaccessibility of Cr and Ni in basaltic soils in Northern Ireland. Journal of Geochemical Exploration, 183, 166-177. <u>https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2017.02.006</u>

Denys, S., Caboche, J., Tack, K., Rychen, G., Wragg, J., Cave, M., Jondreville, C., & Feidt, C. (2012). In Vivo Validation of the Unified BARGE Method to Assess the Bioaccessibility of Arsenic, Antimony, Cadmium, and Lead in Soils. Environmental Science & Technology, 46, 6252-6260. <u>https://doi.org/10.1021/es3006942</u>

Fernández-Caliani, J. C., Giraldez, M. I., & Barba-Brioso, C. (2019). Oral bioaccessibility and human health risk assessment of trace elements in agricultural soils impacted by acid mine drainage. 237, 124441. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124441

Flipo, N., Labadie, P., & Lestel, L. (Éds.). (2021). The Seine River Basin. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-54260-3

Flora, G., Gupta, D., & Tiwari, A. (2012). Toxicity of lead : A review with recent updates. Interdisciplinary Toxicology, 5(2), 47-58. <u>https://doi.org/10.2478/v10102-012-0009-2</u>

Glorennec, P., Lucas, J.-P., Mandin, C., & Le Bot, B. (2012). French children's exposure to metals via ingestion of indoor dust, outdoor playground dust and soil : Contamination data. Environment International, 45, 129-134. https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.04.010

Goix, S., Uzu, G., Oliva, P., Barraza, F., Calas, A., Castet, S., Point, D., Masbou, J., Duprey, J.-L., Huayta, C., Chincheros, J., & Gardon, J. (2016). Metal concentration and bioaccessibility in different particle sizes of dust and aerosols to refine metal exposure assessment. Journal of Hazardous Materials, 317, 552-562. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.05.083

Gong, C., Ma, L., Cheng, H., Liu, Y., Xu, D., Li, B., Liu, F., Ren, Y., Liu, Z., Zhao, C., Yang, K., Nie, Hivert G, Coquet S, Glorennec P, Bard D. Is compliance to current lead regulations safe enough for infants and toddlers?. Rev Epidemiol Sante Publique. 2002 Jun;50(3) 297-305. PMID: 12122346.
Gong C., Ma L., Cheng H., Liu Y., Xu D., Li B., Liu F., Ren Y., Liu Z., Zhao C., Yang K., Nie H., Lang, C. (2014). Characterization of the particle size fraction associated heavy metals in tropical arable soils from Hainan Island, China. Journal of Geochemical Exploration, 139, 109-114. <u>https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2013.01.002</u>

Ikegami, M., Yoneda, M., Tsuji, T., Bannai, O., & Morisawa, S. (2014). Effect of Particle Size on Risk Assessment of Direct Soil Ingestion and Metals Adhered to Children's Hands at Playgrounds. Risk Analysis, 34, 1677-1687. https://doi.org/10.1111/risa.12215

Ineris (2017) - Paramètres d'exposition de l'Homme du logiciel MODUL'ERS. Rapport Ineris-DRC-14-141968-11173C du 23/06/2017

INVS, & INERIS. (2012). Quantités de terre et poussières ingérées par un enfant de moins de 6 ans et bioaccessibilité des polluants : État des connaissances et propositions. Institut national de l'environnement et des risques industriels. Institut de veille sanitaire.

ISO 11464. (2006). Soil quality—Pretreatment of samples for physico-chemical analysis.

ISO 17924 (2019). Soil quality — Assessment of human exposure from ingestion of soil and soil material — Procedure for the estimation of the human bioaccessibility/bioavailability of metals in soil

Kierulf, A., Ollson, C., Whitehead, C., Beauchemin, D., & Koch, I. (2022). Literature review and meta-analysis of gastric and intestinal bioaccessibility for nine inorganic elements in soils and soil-like media for use in human health risk assessment. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 240, 113929. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2022.113929

Lake, L. M., Basta, N. T., & Barker, D. J. (2021). Modifying Effect of Soil Properties on Bio-Accessibility of As and Pb from Human Ingestion of Contaminated Soil. Geosciences, 11, 126. https://doi.org/10.3390/geosciences11030126

Ma, J., Li, Y., Liu, Y., Lin, C., & Cheng, H. (2019). Effects of soil particle size on metal bioaccessibility and healthriskassessment.EcotoxicologyandEnvironmentalSafety,186,109748.https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109748

Mehta, N., Cipullo, S., Cocerva, T., Coulon, F., Dino, G. A., Ajmone-Marsan, F., Padoan, E., Cox, S. F., Cave, M. R., & De Luca, D. A. (2020). Incorporating oral bioaccessibility into human health risk assessment due to potentially toxic elements in extractive waste and contaminated soils from an abandoned mine site. Chemosphere, 255, 126927. <u>https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126927</u>

MTECT. (2023). Diagnostics des sites et sols pollués. Version 1, 2023. Ministère de la transition écologique et de la cohésion des territoires.

MTES. (2017). Méthodologie nationale de gestion des sites et sols pollués. Ministère de l'Environnement, de l'Energie et de la Mer.

Pelfrêne, A., Sahmer, K., Waterlot, C., Glorennec, P., Douay, F., & Le Bot, B. (2020). Evaluation of single-extraction methods to estimate the oral bioaccessibility of metal(loid)s in soils. Science of The Total Environment, 727, 138553. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138553</u>

RIVM. (2001). Re-evaluation of human-toxicological maximum permissible risk levels (711701 025).

RIVM. (2006). How can information on oral bioavailability improve human health risk assessment for lead-contaminated soils? (711701042; p. 108). National Institute for Public Health and the Environment.

Ruby, M. V., & Lowney, Y. W. (2012). Selective Soil Particle Adherence to Hands : Implications for Understanding Oral Exposure to Soil Contaminants. Environmental Science & Technology, 46, 12759-12771. https://doi.org/10.1021/es302473q Saby, N., Arrouays, D., Boulonne, L., Jolivet, C., & Pochot, A. (2006). Geostatistical assessment of Pb in soil around Paris, France. Science of The Total Environment, 367, 212-221. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.11.028</u>

Semple, Kirk. T., Doick, K. J., Jones, K. C., Burauel, P., Craven, A., & Harms, H. (2004). Defining Bioavailability and Bioaccessibility of Contaminated Soil and Sediment is Complicated. Environmental Science & Technology, 38, 228A-231A. <u>https://doi.org/10.1021/es040548w</u>

US EPA. (2000). Short sheet : TRW recommendations for sampling and analysis of soil at lead (Pb) sites (OSWER #9285.7-38).

US EPA. (2017). Method 1340 (SW-846 Update VI). United States Environmental Protection Agency.

US EPA. (2021). Guidance for Sample Collection for In Vitro Bioaccessibility Assay for Arsenic and Lead in Soil and Applications of Relative Bioavailability Data in Human Health Risk Assessment. United States Environmental Protection Agency.

Wani, A. L., Ara, A., & Usmani, J. A. (2015). Lead toxicity : A review. Interdisciplinary Toxicology, 8, 55-64. https://doi.org/10.1515/intox-2015-0009

Yamamoto, N., Takahashi, Y., Yoshinaga, J., Tanaka, A., & Shibata, Y. (2006). Size Distributions of Soil Particles Adhered to Children's Hands. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 51, 157-163. https://doi.org/10.1007/s00244-005-7012-y

Ziegler, E. E., Edwards, B. B., Jensen, R. L., Mahaffey, K. R., & Fomon, S. J. (1978). Absorption and Retention of Lead by Infants. Pediatric Research, 12, 29-34. <u>https://doi.org/10.1203/00006450-197801000-00008</u>

4.2.6. Bilan

Cette étude de cas sur 45 échantillons de sols d'Ile-de-France, contaminés plus spécifiquement en Pb, avait comme objectif d'illustrer l'application de la nouvelle méthodologie sur l'intégration de la bioaccessibilité dans les évaluations des risques sanitaires. Les résultats ont mis en évidence l'importance du choix du mode de préparation des sols qui se doit d'être représentatif de la voie d'exposition d'intérêt. Ainsi, il est crucial de suivre les protocoles de préparation des sols, en particulier la norme ISO 17924 :2019, pour la prise en compte de la bioaccessibilité lors de l'évaluation de l'exposition des populations dans laquelle le sol doit être tamisé à <250 µm sans avoir recours à un broyage mécanique pour déterminer à la fois les concentrations bioaccessibles et totales. En effet, dans cette étude, les concentrations totales étaient généralement supérieures dans les sols tamisés par rapport aux sols broyés. Cette étude a également mis en évidence que le test simplifié HCl peut être utilisé en première approche pour prédire la bioaccessibilité du Pb mais une validation complémentaire est recommandée au travers la réalisation du test UBM sur quelques échantillons pour mieux évaluer l'exposition humaine, en particulier comme il a été observé, que dans cette étude de cas, la prédiction du test HCl avait tendance à surestimer la BAc du test UBM dans la phase G. Enfin, il a été observé que dans de nombreux cas, la bioaccessibilité du Pb dans la

phase G était supérieure à 50%, ce qui confirme les limites de son utilisation pour affiner le risque en suivant la méthode InVS-Ineris (2012). La nouvelle approche a montré que l'ajustement de la DJE en utilisant les données de RBA présente un réel intérêt pour affiner l'évaluation de l'exposition par rapport à l'approche classique basée sur les concentrations totales, ainsi que par rapport à l'approche actuellement recommandée (InVS-Ineris, 2012), car moins limitante pour le Pb.

Chapitre 5 : Discussion générale, conclusions et perspectives

Ce dernier chapitre est une synthèse et une discussion de mes travaux de thèse qui ont permis de contribuer à l'amélioration des évaluations des risques sanitaires par l'utilisation de la bioaccessibilité orale dans les sols. L'étude de la bibliographie, ainsi que l'identification des pratiques et des besoins des acteurs de la gestion des SSP ont notamment mis en évidence le besoin et la pertinence d'utiliser la bioaccessibilité pour permettre une estimation plus réaliste des expositions et des risques sanitaires, ainsi qu'une meilleure gestion des SSP. Mes travaux ont permis d'apporter des éléments de réponse et des perspectives aux trois questions scientifiques identifiées dans le Chapitre 1 :

- Quelle est la plus-value de l'utilisation de la bioaccessibilité des EM (As, Cd, Cr, Ni, Pb et Sb) pour évaluer l'exposition des populations en comparaison des concentrations totales ? Quels sont les facteurs d'influence de la bioaccessibilité ?
- Le test UBM peut-il être étendu et validé à d'autres EM ?
- Comment prendre en compte la bioaccessibilité dans les calculs de risques sanitaires ?

Quelle est la plus-value de l'utilisation de la bioaccessibilité des EM (As, Cd, Cr, Ni, Pb et Sb) pour évaluer l'exposition des populations en comparaison des concentrations totales ? Quels sont les facteurs d'influence de la bioaccessibilité ?

Les moyennes des BAc des EM étudiés dans le Chapitre 3 (lot 1) sont présentées dans le Tableau 37. Ces travaux de thèse ont confirmé que dans la phase G, les bioaccessibilités du Cd et du Pb sont globalement plus élevées. Les bioaccessibilités de l'As et du Ni ont tendance à être de l'ordre d'une dizaine ou d'une vingtaine de pourcents dans les deux phases. Les bioaccessibilités les plus faibles sont observées pour le Cr et le Sb au regard des deux phases. Concernant l'As, le Ni et le Sb, leur bioaccessibilité dans la phase G est dans certains cas égale à celle dans la phase GI. Concernant le Cr et le Ni, leur bioaccessibilité est très faible dans les sols d'origine géogène (<4% en moyenne) ; la bioaccessibilité est très variable dans les sols contaminés par des sources anthropiques. Les moyennes un peu plus faibles de bioaccessibilité pour l'As, le Cd et le Pb par rapport aux pourcentages observés dans la littérature (Billmann et al., 2023) peuvent être dues aux 8 sols (Réunion, Nouvelle-Calédonie, Grèce, Irlande du Nord) pour lesquels les concentrations en As, Cd et Pb proviennent probablement du fond géochimique, ce qui pourrait expliquer leur bioaccessibilité plus faible par rapport aux valeurs couramment observées dans les études sur des sols anthropiques contaminés.

Comme la bioaccessibilité des EM est le plus souvent bien inférieure à 100%, son utilisation permet donc une estimation plus réaliste de l'exposition et permet de reclasser des sols présentant des risques inacceptables lorsque l'évaluation de l'exposition se base sur les concentrations totales, en risque acceptable si l'estimation se base sur les concentrations bioaccessibles comme l'a illustré l'étude pilote sur les sites d'Ile-de-France (Chapitre 4.2). Ainsi, dans certains cas, cela permet une meilleure gestion des friches et zones délaissées en optimisant les coûts tout en sécurisant les risques. De cette manière, certaines zones délaissées peuvent être remises à disposition des populations et améliorer leur bien-être en leur offrant des espaces verts en ville ou des lieux associatifs.

Tableau 37. Synthèse des moyennes des BAc (%) et des extraits dans les fractions mobilisables (F1+F2) de l'extraction séquentielle (%) des sols du lot 1

BAc phase G						
%	Pb	Cd	Ni	As	Cr	Sb
G	45	38	23	17	10	3
GI	6	19	17	11	1	3
F1+F2	50*	31	23	14	9*	26

* ≤1% de Pb et de Cr en F1 ; G : phase gastrique ; GI : phase gastrointestinale ; F1 : Fraction acido-soluble ; F2 : Fraction réductible

Ces travaux, tout comme l'étude de la littérature, ont mis en évidence que l'influence de la matrice du sol sur la bioaccessibilité est complexe car multifactorielle. Souvent des effets sont bien observés mais ces derniers varient selon le sol et l'EM considéré. L'étude des paramètres physico-chimiques (pH, CaCO₃, matière organique, oxydes de Fe, Al, Mn, phosphore assimilable, CEC) n'a pas permis d'identifier de paramètres clés. La distribution des EM au sein des phases porteuses explique mieux la bioaccessibilité que les paramètres physico-chimiques des sols. Les moyennes des pourcentages d'EM extraits dans les fractions mobilisable (F1+F2) sont présentées dans le Tableau 37 et montrent que la bioaccessibilité des EM, notamment dans la phase G, est généralement en cohérence avec leur distribution dans les phases porteuses plus ou moins mobiles (extraction séquentielle), à l'exception du Sb mais dont les concentrations étaient souvent très faibles, augmentant ainsi les incertitudes analytiques.

L'analyse de la minéralogie présente également un intérêt car elle permet de mieux comprendre la bioaccessibilité lorsque l'extraction séquentielle connait des limites liées à la sélectivité des phases. L'affinité du Cr et du Pb pour les phases minérales solubles dans l'acide (e.g. apatite) explique leur forte bioaccessibilité dans la phase G (dissolution) et leur faible bioaccessibilité dans la GI (reformation des phases minérales dissoutes). L'étude de la minéralogie ainsi que de la distribution des EM au sein des différentes phases porteuses est très intéressante dans le domaine de la recherche pour mieux comprendre les mécanismes régissant la BAc. Cependant ces analyses sont difficilement déployables comme outil d'estimation et/ou de prédiction de la bioaccessibilité dans le cadre de la gestion des SSP, en raison des coûts et des temps d'expérimentations. Plutôt que d'essayer de prédire la bioaccessibilité au travers de multiples analyses des matrices du sol, il est plus pertinent et plus rapide également d'un point de vue opérationnel de mesurer directement la BAc.

L'influence du vieillissement des sols combiné ou non à l'apport d'amendements (compost, biochar) sur la mobilité des contaminants pour limiter le transfert du sol vers les plantes est largement étudié dans la littérature, mais seules quelques études se sont intéressées à leur influence sur la bioaccessibilité orale. Deux regards peuvent se porter sur ces travaux : la recherche de la compréhension des mécanismes régissant la BAc ainsi que le point de vue plus opérationnel. D'une part, le vieillissement des sols seul a eu des effets variables sur la bioaccessibilité des EM : des augmentations ou des diminutions, ainsi que l'absence de modification ont pu être observées. Concernant le Cr, sous l'effet du vieillissement, l'évolution (augmentation ou diminution) des concentrations de Cr bioaccessible dans la phase G et de Cr VI était corrélée mais se différenciait selon le sol considéré. D'une manière plus générale, l'hypothèse serait que la faible BAc du Cr dans cette étude puisse être liée au faible pourcentage de Cr VI (en moyenne 1% ; maximum 13%).

L'apport d'amendements est couramment réalisé par des jardiniers amateurs ou professionnels pour de meilleures cultures en améliorant la fertilité des sols. Il est également pratiqué dans des projets d'agriculture urbaine ainsi que par des professionnels SSP lors de l'utilisation de phytotechnologies et particulièrement de phytostabilisation, comme techniques de gestion des pollutions des sols, notamment dans des contextes où la durée du traitement n'est pas une contrainte. L'effet de l'apport d'amendements en combinaison du vieillissement des sols est également variable et peut être bénéfique pour réduire la bioaccessibilité d'un EM en particulier mais pas forcément pour un autre. Il en est de même pour leur influence sur la concentration en Cr VI. Cette variabilité des effets observés souligne à nouveau la complexité des mécanismes régissant la BAc ainsi que l'aspect multifactoriel. Face à ce constat, la pertinence de l'apport d'amendements pour réduire la BAc des EM peut être remise en question dans la mesure où les sols sont rarement mono-contaminés et que leur effet n'est pas systématiquement bénéfique pour réduire la bioaccessibilité à long terme de tous les contaminants présents dans les sols.

205

Malgré cela, d'un point de vue opérationnel, en exprimant la BAc en pourcentage du total, les variations de BAc observées après simulation de vieillissement avec ou sans apport d'amendements sont globalement assez faibles (en général quelques %), à l'exception du sol MF17. Ce dernier présente la particularité, décrite tout au long de ces travaux, d'être issu d'un terril riche en apatite qui est facilement solubilisée dans la phase G. A l'exception de ce site, les faibles variations peuvent être rassurantes pour les opérateurs ayant ajouté des amendements dans des sols présentant une contamination diffuse avec comme objectif de diminuer la mobilité des contaminants. Ainsi, il peut être recommandé de réaliser les mesures de BAc après plusieurs mois, période à adapter selon les enjeux et/ou la complexité du site après l'apport d'amendement en accord avec les recommandations du Guide méthodologique relatif au Plan de Conception des Travaux (PCT) (MTES, 2019).

En termes de perspectives sur ce volet :

- Il serait intéressant de poursuivre l'étude du lien entre la BAc du Cr et le Cr VI sur des sols présentant des pourcentages de Cr VI plus élevés que dans cette étude (13% au maximum). Il est possible que ces faibles pourcentages de Cr VI dans les sols de cette étude soient liés à une réduction rapide du Cr VI en Cr III dans les sols comme observé dans la littérature (Stewart et al., 2003). Une perspective pourrait être de doper des sols avec du Cr VI et d'observer les variations de sa BAc ainsi que de sa spéciation en réalisant plusieurs mesures dans le temps (cinétique) pour simuler le devenir d'une récente contamination en Cr VI ;
- Dans la même idée, les cinétiques d'évolution de la bioaccessibilité pourraient être étudiées sur ce même protocole de vieillissement accéléré mais en prolongeant la durée (10 semaines) afin de simuler 10 années et afin d'étudier si la bioaccessibilité fluctue au cours du temps ou si une stabilisation pérenne peut être obtenue ;
- Des expérimentations en mésosomes (témoin sans amendement, avec compost et avec biochar) pourraient être mises en place sur une durée de 3 ans pour comparer avec les résultats obtenus avec le protocole appliqué dans ces travaux de trois semaines simulant 3 années de vieillissement accéléré en laboratoire ;
- Le remaniement des sols est souvent pratiqué lors de travaux de réaménagement ou de construction ou même dans les potagers ou champs lors du travail des sols (labour). Ainsi, l'influence de ce paramètre, qui par son apport d'oxygène dans les sols peut modifier les conditions redox, pourrait également être étudié, en particulier pour le Cr dont la toxicité du Cr VI est bien plus importante que sa forme réduite le Cr III. De ce fait, une des modalités de l'expérimentation de vieillissement pourrait être soumise à un labour simulé en retournant la partie superficielle des sols testés. Le protocole de vieillissement réalisé a permis de mimer au

mieux les conditions météorologiques spécifique au Nord de la France en simulant des conditions drastiques en termes de températures en accord avec les changements climatiques. A la vue des forts épisodes de pluies l'année de la réalisation de ces travaux (2024), il pourrait également être intéressant d'ajouter ce paramètre aux modalités expérimentales. Dans le protocole utilisé, il aurait notamment pu être ajouté une journée par semaine d'expérimentation à 120% de la saturation en eau entre les cycles de gel/dégel et les cycles à haute température ;

Comme il a été observé que le Cd et le Pb ont tendance à être plus bioaccessibles que les autres EM, il serait intéressant d'orienter des travaux pour identifier l'amendement le plus adapté pour réduire leur bioaccessibilité en priorité, ce qui permettrait d'avoir l'impact le plus significatif lors de l'évaluation des risques sanitaires. En lien avec le constat de la forte affinité observée entre le Cr et le Pb pour l'apatite et sa dissolution dans la phase G induisant une forte bioaccessibilité de ces éléments, des essais pourraient être réalisé sur des amendements utilisant de l'apatite dans le but d'immobiliser les EM, car il pourrait s'avérer que ces amendements soient inefficaces pour réduire la bioaccessibilité des EM du fait de leur dissolution dans l'environnement acide du milieu gastrique.

Conclusion et réponse à la question

- ✓ L'utilisation de la bioaccessibilité des EM permet généralement d'affiner l'exposition en comparaison à la concentration totale dans la mesure où ceux-ci sont rarement solubilisés à 100% par les fluides digestifs.
- Les facteurs d'influence de la bioaccessibilité sont nombreux, bien que des effets soient observés, ils sont généralement spécifiques au site. Quelques effets observés moins variables ont pu être identifiés, en particulier pour le Cr qui était un des EM principalement étudié dans ces travaux (Figure 41).



Le test UBM peut-il être étendu et validé IVIV à d'autres EM ?

Le test UBM est actuellement validé IVIV pour l'As, le Cd et le Pb. Les premiers résultats obtenus dans le cadre de l'étude de la validation du test UBM pour d'autres EM, à savoir le Cr, le Ni et le Sb, ont montré que leur faible biodisponibilité orale ne rend pas possible la validation du test UBM en suivant les critères de validations *in vitro/in vitro* classiquement utilisés. Pourtant, cette faible biodisponibilité mesurée est un résultat très intéressant et pouvoir corriger l'exposition estimée de ces EM aurait un apport considérable pour les acteurs des SSP. Les critères IVIV, sont adaptés pour des EM présentant de larges gammes de biodisponibilité contrairement au Cr, Ni et au Sb, qui sont faiblement biodisponibles. En termes de perspectives :

- Une réflexion est à mener sur les critères IVIV afin de voir comment la validation d'un test in vitro pourrait être adaptée dans le cas de ces EM. Un des critères porte notamment sur le fait d'avoir une gamme suffisamment large de valeurs de biodisponibilité testées (intervalle d'environ 70% entre les valeurs minimales et maximales), ce qui n'a pas été observé pour ces EM ;
- Il pourrait être proposé d'établire trouver un facteur de réduction entre la concentration totale et la RBA, ce qui impliquerait d'appliquer un facteur de sécurité au test UBM. Cette proposition nécessiterait des expérimentations sur plus de sols pour établir un facteur robuste. Dans le cas où la concentration totale serait conservée dans le calcul de la DJE, les évaluateurs de risques pourraient *a minima* indiquer dans l'étape d'évaluation des incertitudes de l'EQRS, que pour ces substances, pour lesquelles de très faibles biodisponibilités sont observées, les calculs de risques sont conservatoires ;
- L'expérimentation in vivo mise en place dans cette étude était basée sur une mesure des EM dans 0 un tissu et/ou organe cible réalisée dans les mêmes conditions que l'étude de Caboche (2009) qui avait permis la validation du test UBM pour l'As, le Cd et le Pb. En restant sur cette méthode, il pourrait être envisagé d'augmenter le temps d'exposition, en passant de 14 jours à 60 jours, afin d'espérer augmenter les concentrations dans les organes et se détacher du bruit de fond résiduel. Seulement, cela augmentera la quantité de sol, qui approcherait sans doute les 10 kg de sol tamisé <250 µm. Cela devrait également multiplier les coûts par 4. Parmi les autres méthodes in vivo, se trouve l'approche pharmaco-cinétique pour laquelle deux voies d'exposition sont considérées : ingestion de la matrice contaminée / injection d'une quantité identique par voie intraveineuse (via une solution où le contaminant est dissous). La mesure de la concentration du contaminant est réalisée dans le sang au cours du temps. La biodisponibilité correspond alors au ratio entre les aires sous la courbe de concentration après administration par voie orale et par intraveineuse. Cette méthode nécessite néanmoins un volume de sang important, un savoir-faire expérimental de pointe, et est difficile à mettre en œuvre notamment pour les EM qui présentent de faibles taux d'absorption et donc de très faibles concentrations dans le sang, ce qui pourrait être un frein pour les éléments comme Cr et Sb notamment. Cette méthode est mieux adaptée à des substances excrétées relativement rapidement pour éviter plusieurs mois d'expérimentation.;
- La littérature a notamment démontré que le Cr VI avait tendance à se réduire en Cr III dans le milieu acide de l'estomac. Ainsi, une étude de la spéciation du Cr VI dans les fluides digestifs synthétiques ou dans les matrices biologiques exposées à des sols contaminés en Cr VI pourrait apporter des informations très intéressantes concernant le devenir du Cr VI. Si la majorité du Cr VI

est effectivement réduite en Cr III, cela limiterait grandement le risque lié à sa présence dans les sols.

Se pose la question d'étendre la validité IVIV du test UBM à d'autres contaminants que ceux étudiés dans la thèse. La caractérisation de la bioaccessibilité d'autres EM présents dans les SSP qui peuvent conduire à des risques sanitaires est intéressant car dans l'évaluation des risques sanitaires sont à prendre en compte des règles d'additivité des risques. Parmi les EM qui tirent classiquement les risques pour la voie d'exposition par ingestion, figurent l'As, le Cd et le Pb à cause de leur présence dans un grand nombre de SSP et de leurs VTR très contraignantes : avec des VTR à effets à seuil de l'ordre du dixième de μ g kg⁻¹ j⁻¹ (As de 0,3 10⁻³ mg kg⁻¹ j⁻¹ (HAS, 2020) ; Cd de 0,35 10⁻³ mg kg⁻¹ j⁻¹ (Anses, 2017) ; Pb de 0,63 10⁻³ mg kg⁻¹ j⁻¹ (Anses, 2013) et pour As une VTR sans seuil de 1,5 (mg kg⁻¹ j⁻¹)⁻¹ (OEHHA, 2011). Concernant le Cr, le Ni et le Sb, bien que moins fréquemment observés dans les SSP, leurs VTR pour les effets à seuil sont de l'ordre de quelques µg kg⁻¹ j⁻¹ (Cr III forme soluble de 5 10⁻³ mg kg⁻¹ j⁻¹ (RIVM, 2001) ; Cr VI de 2,2 10⁻³ mg kg⁻¹ j⁻¹ (Santé Canada, 2021) ; Ni de 13 10⁻³ mg kg⁻¹ j⁻¹ (Efsa, 2020) ; Sb de 6 10^{-3} mg kg⁻¹ j⁻¹ (OMS, 2022) et la VTR sans seuil du Cr VI de 0,5 (mg kg⁻¹ j⁻¹)⁻¹ (OEHHA, 2011). Se pose la question de l'apport que pourrait avoir l'utilisation des données de BAc pour affiner l'exposition à d'autres EM. La recherche des VTR en suivant la note de DGS (2014) a permis de voir que les EM comme l'Al (0,14 mg kg⁻¹ j⁻¹; JECFA, 2011), le Ba (0,2 mg kg⁻¹ j⁻¹; US EPA, 2005, ATSDR, 2007), le B (0,2 mg kg⁻¹ j⁻¹; US EPA, 2004, OMS, 2022), le Cu (0,15 mg kg⁻¹ j⁻¹; Efsa, 2018) le Mn (0,055 mg kg⁻¹ j⁻¹; INSPQ, 2017), l'Sn (0,2 mg kg⁻¹ j⁻¹; RIVM, 2009), Zn (0,3 mg kg⁻¹ j⁻¹; US EPA, 2005) ont des VTR pour la voie orale pour les effets à seuil (les seules disponibles) de l'ordre du dixième de mg kg⁻¹ j⁻¹. Elles sont donc plus élevées et donc moins contraignantes que celles des EM étudiés dans ces travaux, de l'ordre d'un facteur 1000, à l'exception du mercure inorganique (5,7 10⁻⁴ mg kg⁻¹ j⁻¹; Efsa, 2012a, 2012b), en rappel le mercure n'a pas été étudié dans ces travaux en raison de sa présence également sous sa forme élémentaire Hg° volatile (Cf Chapitre 1). Souvent, lorsque ces EM (à l'exception du mercure inorganique) posent des problèmes sanitaires ou environnementaux, leur concentration est si élevée qu'elle est considérée comme une source de pollution concentrée, ce qui est une autre problématique de gestion car cette dernière doit être traitée. Dans la littérature, l'intégration des données de bioaccessibilité dans les calculs de risques n'a souvent pas d'apport très significatif par rapport aux EM plus préoccupants (e.g. As, Cd, Pb et dans une moindre mesure Cr, Ni et Sb). Concernant l'Ag (0,005 mg kg⁻¹ j⁻¹; US EPA, 1991), le Co (0,0015 mg kg⁻¹ j⁻¹; Afssa, 2010), le Mo (0,005 mg kg⁻¹ j⁻¹; US EPA, 1992), le Se (0,005 mg kg⁻¹ j⁻¹; US EPA, 1991), leur VTR à seuil est plus du même ordre de grandeur que celle du Cr, du Ni et du Sb, mais ces EM ne sont pas très fréquemment rencontrés dans les SSP. A la vue de ces VTR disponibles et de leur occurrence dans les SSP, il n'apparaît donc pas forcément pertinent de valider le test UBM

pour tous ces éléments, les 6 EM étudiés (As, Cd, Cr, Ni, Pb et Sb), couvrant une grande part des EM d'intérêt tirant les risques sanitaires présents dans les sols pour la voie d'exposition orale.

Néanmoins, malgré l'absence de validation pour les autres EM, la littérature a montré que beaucoup d'études mesurent la BAc d'EM pour lesquels aucune validation du test de bioaccessibilité n'a été effectuée au regard d'essais *in vivo* et les utilisent dans les ERS. Leur mesure peut apporter des informations concernant les éventuelles compétitions pour les sites de fixation en fonction des affinités.

En termes de perspectives :

 Comme le risque est le résultat d'un croisement entre un danger et une exposition, le risque pour l'humain est également l'additivité de son exposition à son environnement par différentes voies et substances. Ainsi, d'autres perspectives sont le développement de tests de bioaccessibilité pour les composés organiques, d'autres matrices (denrées alimentaires), ou d'autres voies d'exposition (inhalation de particules ou de vapeur) afin de permettre une évaluation du risque sanitaire au plus proche de la réalité.

Conclusion et réponse à la question

- ✓ Pour l'instant, bien que des études statistiques plus poussées soient requises, il ne semble pas possible de valider le test UBM pour le Cr, le Ni et le Sb. Les critères de validation IVIV classiquement utilisés doivent être adaptés à ces EM faiblement biodisponibles.
- ✓ Actuellement, il n'y a pas d'enjeu fort à valider le test UBM à d'autres EM que ceux étudiés dans ces travaux : As, Cd, Cr, Ni, Pb et Sb couvrant une grande part des EM tirant les risques sanitaires présents dans les sols pour la voie d'exposition orale (Figure 42).



Comment prendre en compte la bioaccessibilité orale des EM dans les calculs de risques ?

Les acteurs des SSP doivent se poser la question de la voie d'exposition d'intérêt en amont de réaliser des analyses des concentrations totales en contaminant. Il est important d'utiliser une fraction de sol représentative de la voie d'exposition, pour la mesure de la bioaccessibilité mais aussi de la concentration totale, et ce en suivant la recommandation de la norme ISO 17924:2019 (tamisage à 250 µm sans avoir recours à un broyage mécanique). Si l'ingestion de sol est la voie d'intérêt, réaliser uniquement la mesure de la concentration totale (tamisée <250 µm sans avoir recours à un broyage mécanique). Si l'ingestion de sol est la voie d'intérêt, réaliser uniquement la mesure de la concentration totale (tamisée <250 µm sans avoir recours à un broyage mécanique) éviterait des coûts supplémentaires non négligeables liés à la réalisation d'une seconde

analyse dans le cas où la première analyse a été réalisée sur une fraction broyée et que la décision d'avoir recours à la bioaccessibilité pour affiner le risque est prise ensuite.

D'un point de vue opérationnel, la promotion de l'utilisation de la BAc par les acteurs des SSP connait des freins liés actuellement au prix du test UBM, en particulier lors de campagnes d'analyse sur de nombreux échantillons. De plus, seul un nombre limité de laboratoires proposent aujourd'hui sa réalisation à cause de sa complexité qui nécessite un réel savoir-faire. L'étude sur les sols du Lot 1 d'Ile-de-France a montré que le test simplifié à l'HCl permet de prédire la BAc de l'As, du Cd et du Pb au moyen des équations définies par Pelfrêne et al., (2020), et ce, dans les deux phases, ce qui renforce la validité de son utilisation en tant qu'outil prédictif. Ce test est également prometteur pour être utilisé comme proxy pour prédire la bioaccessibilité du Cr, du Ni et du Sb mesurée par le test UBM dans la phase G.

Dans le cas des sols du Lot 2 d'Ile-de-France, le test simplifié HCI surestimait de 20 à 30% la bioaccessibilité prédite du Pb. Cette observation reste néanmoins rassurante car protectrice. L'hypothèse a été émise que pour ces sites d'Ile-de-France géographiquement proches et au contexte similaire, la BAc peut se comporter de manière similaire, et dans ce cas être surestimée de manière semblable pour tous les sols de l'étude. Ces observations soulignent le fait que le test simplifié HCI n'a pas vocation à remplacer le test UBM et qu'une vérification avec le test UBM pour quelques échantillons est recommandée. Seules les bioaccessibilités mesurées avec le test UBM sont à utiliser dans les évaluations des risques sanitaires. Il peut être recommandé de vérifier entre 10 et 50% (à adapter selon le nombre d'échantillons analysés, l'usage des sites, les enjeux...) des échantillons sélectionnés, en réalisant le test UBM en complément, lors d'une grande campagne d'analyses. Il pourrait également être recommandé d'appliquer un facteur correctif si une sur ou sous-estimation similaire est observée pour plusieurs échantillons d'un même site mais plus d'études sur des sites d'usages et de zone géographique proche sont nécessaires avant de pouvoir statuer sur une telle recommandation.

En termes de perspectives :

 La prédiction de la bioaccessibilité par le test simplifié HCl est prometteuse pour le Cr, le Ni et le Sb, notamment pour prédire la phase G. Des premières équations ont été établies, qu'il serait néanmoins nécessaire de renforcer avec des mesures sur un plus grand nombre de sols, présentant une grande variabilité en termes de paramètres physico-chimiques et de degré de contamination. En rappel, dans l'étude de Pelfrêne et al., (2020), 208 sols (séparés en 2 sets : un set d'élaboration des modèles de régression et un set pour la validation) ont servi à l'établissement des équations pour l'As, le Cd et le Pb. Une démarche similaire pourrait être menée sur le Cr et le Ni.

213

Il est recommandé d'utiliser la phase pour laquelle les meilleures corrélations IVIV ont été obtenues. Dans le cas du Cd et du Pb, il s'agit de la phase gastrique. Pour l'As, les corrélations dans les deux phases sont équivalentes, le choix de la phase doit se faire au cas par cas en sélectionnant la phase présentant la valeur de bioaccessibilité la plus élevée. Parmi les freins à l'utilisation de la bioaccessibilité mesurée avec le test UBM figurent son coût et sa complexité. En plus de l'utilisation du test simplifié HCl en première approche, il peut être proposé d'interrompre le test UBM à la simulation de la phase G pour le Cd et le Pb dans la mesure où les meilleures corrélations IVIV sont observées dans cette phase. Cela réduirait significativement le temps d'expérimentation, le nombre de réactifs à utiliser, le matériel utilisé ainsi que le nombre de solutions à analyser et permettrait une réduction du coût total. Un constat similaire a sans doute conduit l'US EPA à passer du test PBET simulant deux phases, à la recommandation du test SBET (Method 1340) ne simulant plus que la phase G. La simulation de la phase GI, bien qu'il s'agisse de la phase simulant le lieu de l'absorption des EM (RIVM, 2000) et donc la plus réaliste d'un point de vue physiologique, peut être discutée. Lors de la simulation de la phase GI, le pH est ajusté à 6,3 ± 0,5 avant les 4 heures d'extraction. La BAc n'est mesurée qu'à la fin de l'extraction, période durant laquelle le Cd et le Pb peuvent former des précipités ou des complexes en raison de l'augmentation du pH de l'environnement GI. Cependant, dans un organisme vivant, l'augmentation du pH due à l'arrivée des fluides intestinaux et l'absorption se produisent simultanément et progressivement le long de l'intestin grêle. Si le processus d'absorption des EM est plus rapide que le processus de précipitation induit par l'augmentation du pH, la mesure de la BAc en fin d'expérimentation ne reflète pas nécessairement la réalité physiologique. Ainsi, le modèle GI peut être fragilisé pour l'estimation de la BAc pour certains sols. En revanche, si le sol contient de l'As, il est toujours recommandé de simuler les deux phases car il n'a pas été possible de statuer sur le choix d'une phase. En effet, contrairement au Cd et au Pb, l'As est moins sensible aux variations de pH expliquant sa bioaccessibilité souvent équivalente dans les deux phases, et dans certains rares cas, supérieure dans la phase GI.

La méthodologie InVS-Ineris (2012) reste applicable à ce jour jusqu'à la sortie du nouveau guide national prévue d'ici début 2025, cette dernière recommande l'utilisation de facteurs d'ajustement pour la détermination de la RBA à partir de la BAc. Dans le cas du Pb, le facteur 2 limite l'utilisation de la BAc pour affiner l'exposition et les risques dès lors que sa BAc est supérieure à 50%. C'est ce constat qui a notamment motivé la recherche d'une nouvelle approche, moins limitante dans l'utilisation des données de bioaccessibilité du Pb. L'ajustement de la DJE par la RBA déterminée au travers des équations *in vitro/in vivo* est une proposition de méthode permettant l'utilisation des données de BAc pour l'As, le Cd et le Pb. Elle est particulièrement intéressante car restreint moins son utilisation, notamment pour le Pb qui de plus est l'un des contaminants le plus répandu et problématique en France et à travers le monde. En termes de perspectives :

La nouvelle approche pour l'intégration de la BAc dans les calculs de risques n'est pas dépendante de la VTR utilisée, ainsi elle restera valable si le choix des VTR devait évoluer dans le futur. Par ailleurs, il a été observé dans l'état de l'art que peu de pays proposent actuellement une méthodologie pour l'intégration de la bioaccessibilité. Chaque pays a ses propres recommandations en termes de VTR à utiliser, ainsi cette nouvelle méthode peut être proposée aux pays ne proposant pas encore de démarche pour l'intégration de la bioaccessibilité dans les ERS mais qui souhaitent utiliser la bioaccessibilité (test UBM) lors des ERS.

Conclusion et réponse à la question

 ✓ Une méthodologie visant à caractériser la bioaccessibilité et à l'intégrer dans l'évaluation des risques sanitaires liés à la contamination des sols pour l'As, le Cd et le Pb a été présentée dans ces travaux et est schématisée dans la Figure 43.



Références

Afssa (2010). Saisine n° 2010-SA-0095. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à une demande d'appui scientifique et technique sur la migration de cobalt de plats à gratin en porcelaine destinés à entrer en contact avec des aliments. Mai 2010. <u>https://www.anses.fr/fr/system/files/MCDA2010sa0095.pdf</u>

Anses (2013). Expositions au plomb : effets sur la santé associés à des plombémies inférieures à 100 μ g/L. Avis de l'Anses. Rapport d'expertise collective. Janvier 2013

https://www.anses.fr/system/files/CHIM2011sa0219Ra.pdf

Anses (2017). Exposition au cadmium - Propositions de valeurs toxicologiques de référence par ingestion, de valeurs sanitaires repères dans les milieux biologiques (sang, urines, ...). Saisine « 2015-SA-0140 ». RAPPORT d'expertise collective. Comité d'experts spécialisé « Valeurs sanitaires de référence ». Novembre 2017. https://www.anses.fr/system/files/VSR2015SA0140Ra-1.pdf

Anses (2013). Opinion of the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (2011-SA-0219). French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety.

ATSDR (2007). Toxicological Profile for Barium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA: U.S department of Health and Human Services, Public Health Services.

Billmann, M., Hulot, C., Pauget, B., Badreddine, R., Papin, A., & Pelfrêne, A. (2023). Oral bioaccessibility of PTEs in soils : A review of data, influencing factors and application in human health risk assessment. Science of The Total Environment, 896, 165263. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165263</u>

Billmann, M., Pelfrêne, A., Hulot, C., Papin, A., & Pauget, B. (2024). Toward a more realistic estimate of exposure to chromium and nickel in soils of geogenic and/or anthropogenic origin : Importance of oral bioaccessibility. Environ Geochem Health. <u>https://doi.org/10.1007/s10653-024-02041-z</u>

Boron and Compounds CASRN 7440-42-8 | DTXSID3023922 | IRIS | US EPA, ORD

Caboche, J. (2009). Validation d'un test de mesure de bioaccessibilité. Application à 4 éléments traces métalliques dans les sols : As, Cd, Pb et Sb. Institut National Polytechnique de Lorraine.

Cave, M. R., Wragg, J., Denys, S., Jondreville, C., & Feidt, C. (2011). Oral Bioavailability. In F. A. Swartjes (Éd.), Dealing with Contaminated Sites (p. 287-324). Springer Netherlands. <u>https://doi.org/10.1007/978-90-481-9757-67</u>

Collas, C. (2023). Soil ingestion, a key determinant of exposure to environmental contaminants. The case study of chlordecone exposure in free-range pigs in the French West Indies. Environmental Pollution.

Dagois, R., Schwartz, C., Coussy, S., Lorgeoux, C., Ouvrard, S., & Faure, P. (2016). Climatic influence on mobility of organic pollutants in Technosols from contrasted industrial activities. Journal of Soils and Sediments, 16(4), 1306-1315. <u>https://doi.org/10.1007/s11368-015-1108-4</u>

DeMichele S.J., (1984). Nutrition of lead. Comp Biochem Physiol A 78[3], 401-408. 1984. Ref Type: Journal (Full).

Denys, S., Caboche, J., Tack, K., Rychen, G., Wragg, J., Cave, M., Jondreville, C., & Feidt, C. (2012). In Vivo Validation of the Unified BARGE Method to Assess the Bioaccessibility of Arsenic, Antimony, Cadmium, and Lead in Soils. Environmental Science & Technology, 46, 6252-6260. <u>https://doi.org/10.1021/es3006942</u>

EFSA (2010). Scientific opinion on lead in food. EFSA Panel on Contaminants in the food chain (CONTAM). April 2010; EFSA Journal 8: 1-147.

https://www.researchgate.net/publication/281935002_Scientific_opinion_on_lead_in_food_EFSA_Panel_on_ Contaminants in the food chain CONTAM

EFSA (2012a). Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. EFSA J. 10, 2985.

EFSA (2012b). Scientific Opinion of the EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. In The EFSA journal, N°10 (12). Parma: EFSA.

EFSA (2014). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for chromium. European Food Safety Authority. https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2014.3845

EFSA (2020). Update of the risk assessment of nickel in food and drinking water. https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2020.6268

EFSA (2018). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance copper compounds copper(I), copper(II) variants namely copper hydroxide, copper oxychloride, tribasic copper sulfate, copper(I) oxide, Bordeaux mixture. European Food Safety Authority. EFSA Journal 2018;16:5152.

Engström A., Michaëlsson K., Suwazono Y., Wolk A., Vahter M., Akesson A., (2011). Long-term cadmium exposure and the association with bone mineral density and fractures in a population-based study among women. J Bone Miner Res. 2011 Mar; 26(3):486-95.

Engström A., Michaëlsson K., Vahter M., Julin B., Wolk A., Åkesson A., (2012). Associations between dietary cadmium exposure and bone mineral density and risk of osteoporosis and fractures among women, Bones 50 (2012) 1372-1378.

Goix, S., Uzu, G., Oliva, P., Barraza, F., Calas, A., Castet, S., Point, D., Masbou, J., Duprey, J.-L., Huayta, C., Chincheros, J., & Gardon, J. (2016). Metal concentration and bioaccessibility in different particle sizes of dust and aerosols to refine metal exposure assessment. Journal of Hazardous Materials, 317, 552-562. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.05.083

HAS (2020) - Dépistage, prise en charge et suivi des personnes potentiellement surexposées à l'arsenic inorganique du fait de leur lieu de résidence. Méthode Recommandations pour la pratique clinique - Texte des recommandations et argumentaire, Haute Autorité de santé.

INSPQ (2017). Institut national de santé publique du Québec https://www.inspq.qc.ca/eau-potable/manganese

InVS, & INERIS. (2012). Quantités de terre et poussières ingérées par un enfant de moins de 6 ans et bioaccessibilité des polluants : État des connaissances et propositions (p. 83). Institut national de l'environnement et des risques industriels. Institut de veille sanitaire.

JECFA (2011). Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), Summary and conclusions of the seventy-fourth meeting, Rome, 14-23 June 2011, JECFA/74/SC.

Juhasz, A. L., Basta, N. T., & Smith, E. (2013). What is required for the validation of in vitro assays for predicting contaminant relative bioavailability? Considerations and criteria. Environmental Pollution, 180, 372-375. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.05.008 Liang, S., Guan, D.-X., Li, J., Zhou, C.-Y., Luo, J., & Ma, L. Q. (2016). Effect of aging on bioaccessibility of arsenic and lead in soils. Chemosphere, 151, 94-100. <u>https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.070</u>

Littell, R. C., Henry, P. R., Lewis, A. J., & Ammerman, C. B. (1997). Estimation of relative bioavailability of nutrients using SAS procedures. Journal of Animal Science, 75(10), 2672. <u>https://doi.org/10.2527/1997.75102672x</u>

Ma, J., Li, Y., Liu, Y., Lin, C., & Cheng, H. (2019). Effects of soil particle size on metal bioaccessibility and healthriskassessment.EcotoxicologyandEnvironmentalSafety,186,109748.https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109748

MTES, (2017). Méthodologie nationale de gestion des sites et sols pollués. Ministère de l'Environnement, de l'Enrgie et de la Mer.

Nguyen, X. (2019). Evaluation de l'exposition des populations aux polluants dans des néosols issus de sédiments de curage : Effet du vieillissement sur la disponibilité environnementale et la bioaccessibilité orale.

NTP, (2008). Toxicology and carcinogenesis studies of sodium dichromate dihydrate (08-5887). National Toxicology Program.

OEHHA (2011). Public Health Goal for Chemicals in drinking water - Hexavalent Chromium (Cr VI).

OEHHA (2011). California Office of Environmental Health Hazard Assessment. Appendix B: Chemical-Specific Summaries of the Information Used to Derive Unit Risk and Cancer Potency Values Dans: OEHHA, ed. Sacramento: OEHHA; 2011. p. B40-B50. <u>https://oehha.ca.gov/media/downloads/crnr/appendixb.pdf</u>

OMS (2022) - Guidelines for drinking-water quality: Fourth edition incorporating the first and second addenda. <u>https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1414381/retrieve</u>

OMS (2022). Guidelines for drinking-water quality: Fourth edition incorporating the first and second addenda. World Health Organization. <u>https://www.who.int/publications/i/item/9789240045064</u>

Oomen, A. G., Brandon, E. F. A., Swartjes, F. A., Lijzen, J. P. A., & Sips, A. J. A. M. (2006). How Can Information on Oral Bioavailability Improve Human Health Risk Assessment for Lead-contaminated Soils? Implementation and Scientific Basis: RIVM Report, 108. <u>https://doi.org/10.1097/00001648-200611001-00065</u>

Paustenbach, D. J. (2000). The Practive Of Exposure Assessment : A State-Of-The-Art Review. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, 3(3), 179-291. <u>https://doi.org/10.1080/10937400050045264</u>

Pelfrêne, A., Sahmer, K., Waterlot, C., Glorennec, P., Douay, F., & Le Bot, B. (2020). Evaluation of single-extraction methods to estimate the oral bioaccessibility of metal(loid)s in soils. Science of The Total Environment, 727, 138553. <u>https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138553</u>

Rauret, G., López-Sánchez, J. F., Sahuquillo, A., Rubio, R., Davidson, C., Ure, A., & Quevauviller, Ph. (1999). Improvement of the BCR three step sequential extraction procedure prior to the certification of new sediment and soil reference materials. Journal of Environmental Monitoring, 1, 57-61. <u>https://doi.org/10.1039/a807854h</u>

RIVM (2001). Re-evaluation of human toxicological maximum permissible risk levels. National Institute of Public Health and the Environment.

RIVM (2009). Re-evaluation of some human-toxicological Maximum Permissible Risk levels earlier evaluated in the period 1991-2001. Report 711701092/2009. <u>http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/711701092.pdf</u>

RIVM (2000). Methodolies to study human intestinal absorption. A review (630030 001)

RIVM (2001). Re-evaluation of human-toxicological maximum permissible risk levels (711701 025)

Roussel, H., Waterlot, C., Pelfrêne, A., Pruvot, C., Mazzuca, M., & Douay, F. (2010). Cd, Pb and Zn Oral Bioaccessibility of Urban Soils Contaminated in the Past by Atmospheric Emissions from Two Lead and Zinc Smelters. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 58, 945-954. https://doi.org/10.1007/s00244-009-9425-5

Santé Canada (2021). L'évaluation des risques pour les sites contaminés fédéraux au Canada : Valeurs toxicologiques de référence (VTR), version 3.0.

Tseng, W. P., (1977). Effects and dose-response relationships of skin cancer and blackfoot disease with arsenic. Environ Health Perspect 1977;19:109-19

Tseng, W. P., Chu, H. M., How, S. W., Fong, J. M., Lin, C. S. & Yeh, S., (1968). Prevalence of skin cancer in an endemic area of chronic arsenicism in Taiwan. J Nat I Cancer Inst 40(3): 453-463

US EPA (1991). Integrated Risk Information System. Arsenic, inorganic - CAS number 7440-38-2 https://cfpub.epa.gov/ncea/iris2/chemicalLanding.cfm?substance nmbr=278

US EPA (1991). Integrated Risk Information System. Selenium and Compounds CASRN 7782-49-2. https://cfpub.epa.gov/ncea/iris2/chemicalLanding.cfm?substance_nmbr=472

US EPA (1998). Integrated Risk Information System. Arsenic, Inorganic CASRN 7440-38-2. https://cfpub.epa.gov/ncea/iris2/chemicalLanding.cfm?substance_nmbr=278

US EPA (1991). Integrated Risk Information System. Silver CASRN 7440-22-4 Silver CASRN 7440-22-4 | DTXSID4024305 | IRIS | US EPA, ORD

US EPA (1992). Integrated Risk Information System. Molybdenum CASRN 7439-98-7 Molybdenum CASRN 7439-98-7 | DTXSID1024207 | IRIS | US EPA, ORD

US EPA (2004). Integrated Risk Information System. Boron and Compounds CASRN 7440-42-8

US EPA (2005). Integrated Risk Information System. Zinc and Compounds CASRN 7440-66-6 Zinc and Compounds CASRN 7440-66-6 | DTXSID7035012 | IRIS | US EPA, ORD

US EPA (2005). Integrated Risk Information System. Barium and Compounds CASRN 7440-39-3. https://cfpub.epa.gov/ncea/iris2/chemicalLanding.cfm?substance nmbr=10

US EPA. (2007). Guidance for Evaluating the Oral Bioavailability of Metals in Soils for Use in Human Health Risk Assessment (OSWER 9285.7-80; p. 20). United States Environmental Protection Agency

US EPA. (2017). Update for Chapter 5 of the Exposure Factors Handbook Chapter 5—Soil and Dust Ingestion (EPA/600/R-17/384F)

Wragg, J., Cave, M., Basta, N., Brandon, E., Casteel, S., Denys, S., Gron, C., Oomen, A., Reimer, K., Tack, K., & Van de Wiele, T. (2011). An inter-laboratory trial of the unified BARGE bioaccessibility method for arsenic, cadmium and lead in soil. Science of The Total Environment, 409, 4016-4030. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.05.019

Xia, Y., Wade, T. J., Wu, K., Li, Y., Ning, Z., Le, X. C., Chen, B., Feng, Y., Mumford, J. L. & He, X., (2009) - Well water arsenic exposure, arsenic induced skin-lesions and self-reported morbidity in Inner Mongolia. International journal of environmental research and public health 6: 1010-1025.

Yamamoto, N., Takahashi, Y., Yoshinaga, J., Tanaka, A., & Shibata, Y. (2006). Size Distributions of Soil Particles Adhered to Children's Hands. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 51, 157-163. https://doi.org/10.1007/s00244-005-7012-y

Ziegler, E. E., Edwards, B. B., Jensen, R. L., Mahaffey, K. R., & Fomon, S. J. (1978). Absorption and Retention of Lead by Infants. Pediatric Research, 12, 29-34. <u>https://doi.org/10.1203/00006450-197801000-00008</u>

Annexes

SM1 : Annexe de l'article "Population exposure to chromium and nickel in soils of geogenic and/or anthropogenic origin: Importance of oral bioaccessibility"

SM1.1. Wilcoxon-Mann-Whitney Rank Sum two-sided test to compare soils with geogenic contamination (n = 8) with anthropogenic soils (n = 19) according to BAc Cr and Ni (G and GI phase), soil physicochemical parameters and their distribution

Parameter	P value	Mean anthropogen ic	Mean geogenic	Parameter	P val ue	Mean anthropogeni c	Mean geogenic
Cr tot	0.938	2614	4676	K+ cool+/kg	0.2 60	0.7	0.5
Ni tot	0.106	578	3093	Fe oxides mg/kg	0.1 32	22406	34610
Cr G %	0.001	13.4	1.7	Al oxides mg/kg	0.0 22	632	6303
Cr GI %	0.039	1.4	0.6	Mn oxides mg/kg	0.0 58	445	1839
Ni G %	<0,000 1	22.2	3.6	Cr F1 %	0.1 98	0.4	0.2
Ni GI %	0.000	17.2	2.5	Cr F2 %	0.0 00	11.0	2.1
Cr IV %	0.856	1.8	0.4	Cr F3 %	0.0 22	27.4	11.6
Cr VI mg/kg	0.549	115.4	18.9	Cr F4 %	0.0 04	61.3	86.1
рН	0.000	7.6	6.1	Cr F1+F2 %	0.0 00	11.3	2.2
CaCO₃ g/kg	0.003	64.2	6.8	Cr F1+F2+F3 %	0.0 04	38.7	13.9
P ₂ O ₅ mg/kg	0.015	384.6	21.4	Ni F1 %	0.0 02	7.4	1.3
MO %	0.084	11.8	18.8	Ni F2 %	0.0 02	25.3	6.4
CEC cmol+/kg	0.180	37.4	30.6	 Ni F3 %	0.3 89	11.4	8.2
Ca+ cmol+/kg	0.022	34.3	23.1	Ni F4 %	0.0 02	55.8	84.1
Mg+ cmol+/kg	0.180	2.3	6.9	Ni F1+F2 %	0.0 01	32.7	7.7
Na+ cmol+/kg	0.003	0.0	0.1	Ni F1+F2+F3 %	0.0 02	44.2	15.9

P-values in bold are significant at the 0.05 level and indicate that the difference in means is not equal to zero; The blue color indicates that the mean for geogenic contaminated soils is higher than anthropogenic soils; The yellow color indicates that the mean for geogenic contaminated soils is lower than anthropogenic soils; F1: exchangeable, water- and acid soluble fraction, F2: reducible fraction, F3: oxidizable fraction, F4: residual fraction; F1+F2 and F1+F2+F3 are the addition of percentage extraction PTE in each fraction.

Variables	Cr G	Cr Gl	Ni G	Ni GI
Cr	-0.56	-0.42	-0.51	-0.50
Ni	-0.47	-0.15	-0.36	-0.29
Cr VI	0.40	-0.05	0.42	0.35
рН	-0.18	-0.14	-0.17	-0.06
P_2O_5	0.21	0.00	0.15	0.25
CaCO₃	0.50	-0.10	0.35	0.41
MO	0.09	-0.09	-0.08	-0.24
CEC	0.15	-0.35	-0.08	-0.16
Ca⁺	0.08	-0.36	-0.11	-0.22
Mg⁺	0.17	-0.26	0.09	0.06
Na⁺	0.42	0.12	0.38	0.39
K ⁺	0.22	-0.33	0.06	-0.11
Fe oxides	-0.13	-0.15	-0.17	-0.28
Al oxides	0.22	-0.40	0.14	0.05
Mn oxides	-0.26	-0.11	-0.34	-0.35
F1	0.23	0.63	0.69	0.65
F2	0.32	0.69	0.39	0.46
F3	0.26	0.40	0.70	0.64
F4	-0.33	-0.63	-0.71	-0.72
F1+F2	0.32	0.69	0.56	0.61
F1+F2+F3	0.33	0.63	0.71	0.72

SM1.2. Spearman correlation depending on contamination origin Spearman anthropogenic contaminated soils (n=19)

Spearman	anthropogenic	contaminated so	bils (n=19)

Values in bold are significant at the 0.05 level.

Variables	Cr G	Cr GI	Ni G	Ni GI
Cr	-0.81	-0.74	0.29	0.50
Ni	-0.74	-0.74	0.29	0.33
Cr VI	0.51	0.66	-0.02	0.02
рН	-0.71	-0.60	0.05	0.36
P_2O_5	-0.41	-0.37	0.37	0.38
CaCO ₃	0.00	0.00	-0.05	-0.17
MO	0.62	0.57	-0.76	-0.95
CEC	0.14	0.31	-0.07	0.05
Ca⁺	0.19	0.38	-0.19	-0.02
Mg ⁺	-0.14	-0.12	0.43	0.55
Na⁺	0.52	0.64	-0.48	-0.40
K ⁺	0.48	0.62	-0.12	-0.05
Fe oxides	0.57	0.57	-0.60	-0.60
Al oxides	0.64	0.57	-0.60	-0.76
Mn oxides	-0.60	-0.62	0.19	0.36
F1	0.95	0.95	0.95	0.86
F2	0.57	0.79	0.74	0.93
F3	0.86	0.76	0.02	0.05
F4	-0.93	-0.86	-0.48	-0.45
F1+F2	0.57	0.79	0.76	0.95
F1+F2+F3	0.93	0.86	0.48	0.45

Spearman correlation geogenic contaminated soils (n=8)

Values in bold are significant at the 0.05 level.

SM2 : Annexe de l'article "Influence of soil aging on oral bioaccessibility of Cr, Ni and other PTEs in multicontaminated soils with or without changes in practices"



SM2.1. Bioaccessibility (expressed in mg kg⁻¹) of PTEs in study soils



























■Sb G □Sb Gl



■Cr G ■Cr Gl 0.6 A* A* mg kg-1 0.4 ₽ а AВ a a а В а 0.2 0.0 Т0 Т0 Т3 Т3 Т0 Т3 Control Biochar Compost ∎As G 0.3 0.5 0.3 0.5 0.3 0.5 □As Gl 0.3 0.3 0.3 0.3 0.3 0.3









■Sb G ■Sb Gl













■Cd G ■Cd Gl

■Sb G □Sb Gl

Soil	Modality		Cr G	Cr GI	Ni G	Ni GI	As G	As GI	Cd G	Cd GI	Pb G	Pb GI	Sb G	Sb GI
		т0	82	0.34	35	32	45	28	57	6.4	55	2.8	21	10.3
	Control	Т3	81	0.18	62	30	86	16	102	4.9	80	0.8	35	4.9
	D: 1	Т0	80	0.44	35	32	45	36	55	6.9	54	2.3	20	13.1
51	Biochar	Т3	79	0.05	58	29	83	13	90	4.0	80	0.7	31	4.4
-	<u> </u>	Т0	78	0.98	34	21	44	25	53	3.8	53	2.6	19	8.3
	Compost	Т3	76	0.06	55	25	80	12	82	4.1	75	0.8	28	4.2
	Control	Т0	6.1	2.3	12	11	12	14	43	28	40	12	5.0	3.8
	Control	Т3	7.2	1.5	13	11	13	13	44	21	44	7	5.9	3.2
۔ دع	Diachar	т0	5.9	2.7	12	10	13	13	43	23	40	13	5.4	3.5
52	Biochar	Т3	5.7	1.9	11	11	12	13	44	23	38	10	4.8	2.9
_	Compost	Т0	5.4	1.8	11	11	11	13	44	22	33	9	4.6	2.8
	Composi	Т3	5.7	1.6	12	12	12	13	40	22	39	8	4.8	2.7
	Control	т0	9.1	5.1	23	24	22	28	54	40	47	17	15	33
		Т3	9.1	3.8	23	24	20	32	53	37	41	14	15	29
<u> </u>	Diashar	Т0	9.3	3.7	24	25	20	29	50	38	37	17	13	42
53	Biochar	Т3	9.0	4.2	22	24	21	32	50	36	41	9	20	44
_	Compost	Т0	8.4	4.5	22	20	21	26	48	34	38	19	11	51
	Composi	Т3	8.2	2.4	20	19	21	33	44	34	36	17	24	37
	Control	Т0	3.0	0.70	10	11	5.8	5.2	38	16	39	6.7	1.0	1.4
_		Т3	2.1	0.86	11	12	9.2	6.5	30	14	28	5.7	1.0	1.7
54	Biochar	Т0	2.3	0.83	8	11	6.0	6.3	32	15	31	7.6	0.9	1.5
54		Т3	2.9	0.65	14	15	9.9	6.0	37	16	36	3.9	1.2	1.8
	Compost	Т0	1.9	0.92	8	10	5.8	5.9	28	13	27	6.9	0.9	1.4
		Т3	2.4	0.51	12	11	9.7	5.4	32	12	31	2.4	1.1	1.9
	Control	Т0	24	0.38	63	49	2.0	0.31	78	45	70	0.42	3.7	2.3
-	Control	Т3	18	0.30	58	47	2.5	0.32	82	72	62	0.46	4.5	2.8
55	Biochar	Т0	24	0.45	62	49	2.2	0.34	79	47	71	0.53	3.7	2.4
	ыосна	Т3	20	0.27	60	45	2.7	0.32	87	69	62	0.39	5.0	2.8
	Compost	Т0	24	0.48	60	47	2.3	0.38	84	49	67	0.50	4.1	2.8
	composi	Т3	17	0.55	56	42	2.5	0.38	77	68	57	0.51	5.3	3.2

SM2.2. Bioaccessibility of As, Cd, Pb and Sb (expressed %) in the gastric (G) and gastrointestinal (GI) phases in the 5 study soils before (T0) and after (T3) soil aging and without (Control) and with amendments (Biochar/Compost)

				/	
Reference	Farmer (Adult)	Public park (Adult)	Public park (Child)	Resident (Adult)	Resident (Child)
ACH1	1.41E-06	4.16E-07	3.03E-07	4.17E-07	7.08E-07
ACH2	2.54E-06	7.50E-07	5.46E-07	7.52E-07	1.28E-06
PAR1	1.44E-06	4.27E-07	3.11E-07	4.28E-07	7.27E-07
PAR2	1.40E-06	4.12E-07	3.00E-07	4.13E-07	7.02E-07
PAR3	6.50F-07	1.92F-07	1.40F-07	1.93F-07	3.27F-07
PAR4	1.21E-06	3.58E-07	2.60E-07	3.59E-07	6.09E-07
PAR5	1.19F-06	3.50F-07	2.55E-07	3.51F-07	5.97F-07
PAR6	2.04E-06	6.02E-07	4.38E-07	6.04E-07	1.03E-06
PAR7	3.48F-06	1.03F-06	7.49F-07	1.03F-06	1.75F-06
PAR8	2.84F-06	8.40F-07	6.12F-07	8.42F-07	1.43F-06
PAR9	7.37E-06	2.18E-06	1.59E-06	2.18E-06	3.71E-06
PAR10	1.75F-06	5.17E-07	3.76F-07	5.18F-07	8.81F-07
PAR11	2.41F-06	7.11F-07	5.18F-07	7.13F-07	1.21F-06
PAR12	1.99E-06	5.89E-07	4.29E-07	5.91E-07	1.00E-06
PAR13	2.71E-06	8.02E-07	5.84E-07	8.04E-07	1.37E-06
PAR14	1.85E-06	5.48E-07	3.99E-07	5.49E-07	9.33E-07
PAR15	1.64F-06	4.86F-07	3.53E-07	4.87F-07	8.27F-07
PAR16	1.73E-06	5.12E-07	3.73E-07	5.13E-07	8.72E-07
PAR17	2.37E-06	6.99E-07	5.09E-07	7.01E-07	1.19E-06
PAR18	2.40E-06	7.09E-07	5.16E-07	7.11E-07	1.21E-06
PAR19	2.11E-06	6.24E-07	4.54E-07	6.26E-07	1.06E-06
PAR20	2.62E-06	7.75E-07	5.64E-07	7.77E-07	1.32E-06
PAR21	2.18E-06	6.46E-07	4.70E-07	6.47E-07	1.10E-06
PAR22	2.22E-06	6.55E-07	4.77E-07	6.57E-07	1.12E-06
PAR23	5.07E-06	1.50E-06	1.09E-06	1.50E-06	2.55E-06
PAR24	8.29E-07	2.45E-07	1.78E-07	2.46E-07	4.17E-07
PAR25	7.37E-07	2.18E-07	1.59E-07	2.18E-07	3.71E-07
PAR26	1.04E-06	3.07E-07	2.24E-07	3.08E-07	5.24E-07
PAR27	3.04E-06	8.98E-07	6.54E-07	9.01E-07	1.53E-06
PAR28	4.10E-06	1.21E-06	8.82E-07	1.21E-06	2.06E-06
PAR29	1.73E-06	5.12E-07	3.73E-07	5.14E-07	8.72E-07
PAR30	9.27E-07	2.74E-07	1.99E-07	2.74E-07	4.66E-07
PAR31	5.29E-07	1.56E-07	1.14E-07	1.57E-07	2.66E-07
PAR32	8.10E-07	2.39E-07	1.74E-07	2.40E-07	4.07E-07
PAR33	5.10E-07	1.51E-07	1.10E-07	1.51E-07	2.56E-07
PAR34	1.62E-06	4.79E-07	3.49E-07	4.81E-07	8.16E-07
PAR35	3.90E-06	1.15E-06	8.38E-07	1.15E-06	1.96E-06
PAR36	7.59E-07	2.24E-07	1.63E-07	2.25E-07	3.82E-07
PAR37	9.34E-07	2.76E-07	2.01E-07	2.77E-07	4.70E-07
PAR38	4.81E-06	1.42E-06	1.04E-06	1.43E-06	2.42E-06
PAR39	1.41E-06	4.18E-07	3.04E-07	4.19E-07	7.11E-07
SSD1	6.85E-06	2.02E-06	1.47E-06	2.03E-06	3.45E-06
SSD2	9.31E-07	2.75E-07	2.00E-07	2.76E-07	4.68E-07
SSD3	4.98E-07	1.47E-07	1.07E-07	1.47E-07	2.50E-07
VIN1	1.11E-06	3.28E-07	2.39E-07	3.29E-07	5.59E-07

SM3 : Annexe de l'article "Human health risk assessment of lead exposure from soil ingestion in a French pilot study: Insights from the application of a new bioaccessibility approach"

Résumé

La problématique de la contamination des sols, et notamment aux éléments métalliques (EM), est un défi majeur auquel de nombreux pays sont confrontés à travers le monde. L'augmentation de la population mondiale et l'urbanisation poussent à la reconquête des sites à passifs environnementaux (souvent contaminés) autrefois délaissés. Il est alors nécessaire de sécuriser d'un point de vue sanitaire les nouveaux usages de ces sites. Cependant, l'évaluation des risques sanitaires, basées classiquement sur les concentrations totales, peut diverger de celle plus réaliste basée sur les concentrations biodisponibles (concentrations ayant réellement atteint les sites d'action). C'est pourquoi en France, il est recommandé d'intégrer la biodisponibilité orale via la mesure de la bioaccessibilité au moyen du test normé UBM (Unified Bioaccessibility Method ; ISO 17924:2019). Ce test in vitro mime la phase de solubilisation des EM par les fluides digestifs et est validé en comparaison à un modèle animal (porcelet) pour l'As, le Cd et le Pb. Mais, cette méthode n'est pas encore suffisamment intégrée comme outil permettant d'affiner les évaluations de risques sanitaires. À la suite de ce constat, l'objectif de ce travail était d'améliorer la caractérisation des expositions des populations lors des calculs de risques sanitaires au travers de la prise en compte de la bioaccessibilité. Dans ce but, la bioaccessibilité du Cr et Ni, deux autres éléments d'intérêt dans la gestion SSP a été étudiée. Mes travaux ont montré l'intérêt de s'intéresser à ces éléments car leur bioaccessibilité tant pour la phase gastrique que gastro-intestinale est identifiée comme majoritairement faible (<20% pour le Cr et <30% pour le Ni). Ces résultats ont été confirmés par les premières estimations de la biodisponibilité mesurée lors des essais in vivo qui apparait être faible également. L'influence du temps avec ou sans apport d'amendements a également été étudiée et a permis de montrer que l'ajout d'amendements (compost ou biochar) n'est pas toujours bénéfique à long terme pour réduire les risques sanitaires. Dans le but de promouvoir l'utilisation de la bioaccessibilité, des recommandations opérationnelles ainsi qu'une nouvelle démarche d'intégration de la bioaccessibilité dans les évaluations des risques sanitaires ont été proposés répondant au mieux à certaines difficultés rencontrées par les opérateurs lors de l'utilisation de la bioaccessibilité.

Mots clés : Bioaccessibilité orale ; Biodisponibilité ; Contamination métallique ; Evaluation quantitative des risques sanitaires ; Sites et sols pollués

Abstract

Soil contamination, particularly by potential toxic elements (PTE)s, is a significant challenge that many countries around the world face. As the global population grows and urbanization increases, there is a need to reclaim environmentally degraded sites that were previously abandoned, however, ensuring the safety of these sites for new uses is crucial. Traditionally, health risk assessments have focused on total concentrations of contaminants in soils. Nevertheless, more accurate assessments consider the bioavailable concentrations as it corresponds to the amounts that actually reach the biological sites. In France, oral bioavailability can be integrated into risk assessments through bioaccessibility testing, specifically using the standardized UBM (Unified Bioaccessibility Method; ISO 17924). This in vitro method simulates the solubilization of PTEs by digestive fluids and has been validated on an animal model (piglet) for As, Cd, and Pb. Despite its potential, this method is not yet widely used as a tool for refining health risk assessments. The aim of my research was to enhance the characterization of population exposure in health risk assessments by including bioaccessibility data. This work specifically focused on the bioaccessibility of Cr and Ni, two elements of interest in soil pollution management. These findings highlighted the importance of considering these PTEs, as their bioaccessibility is generally low (<20% for Cr and <30% for Ni). These results were further supported by preliminary in vivo test results, which also indicated low bioavailability. This work also explored the impact of time and the use of amendments (such as compost or biochar) on bioaccessibility. My research showed that adding these amendments does not always provide longterm benefits in reducing health risks. To encourage the use of bioaccessibility in risk assessments, some practical recommendations were submitted as well as a new approach for integrating bioaccessibility into exposure evaluations. These guidelines aim to help practitioners overcome challenges they face when applying bioaccessibility data.

Keywords: Oral bioaccessibility; Bioavailability; Metallic contamination; Quantitative health risk assessment; Polluted sites and soils