Mémoire présenté par

Aurélie PELFRENE

en vue de l'obtention du diplôme d'Habilitation à Diriger des Recherches de l'Université de Lille 1 – Sciences et Technologies

Bioaccessibilité des polluants métalliques

Apport à l'évaluation de l'exposition des populations vivant sur des sites contaminés

Présenté le 19 juillet 2016 devant un jury composé de :

Gabriel Billon	Professeur à l'Université de Lille 1	Rapporteur
Camille Dumat	Professeur à l'INPT	Rapporteur
Cyril Feidt	Professeur à l'Université de Lorraine	Rapporteur
Rodolphe Gilbin	Chef de laboratoire, HDR, à l'IRSN	Examinateur
Philippe Glorennec	Professeur à l'EHESP	Examinateur
Corinne Hulot	Ingénieur d'études et de recherches à l'INERIS	Invitée
Francis Douay	Enseignant-chercheur, HDR, à l'ISA Lille	Garant

RESUME

Dans les régions industrialisées, les concentrations en polluants métalliques des différents compartiments environnementaux, et notamment des sols, se sont accrues depuis de nombreuses années, au point parfois d'affecter grandement leur qualité et leurs fonctions. Cet enrichissement en métaux dans les sols est très variable dans le temps et dans l'espace et peut présenter des dangers environnementaux mais également, sanitaires pour les populations, notamment celles vivant dans des environnements industriels ou ayant été affectés par le passé par des émissions atmosphériques.

Parmi les enjeux de la gestion des sites et sols contaminés, l'évaluation de l'exposition des populations aux polluants métalliques est une question scientifique majeure. La présence de métaux dans les sols entraîne des expositions directes, en lien avec l'ingestion et l'inhalation de particules de terre et de poussières, ou indirectes, en lien avec la consommation de denrées autoproduites (légumes ou fruits dans les jardins potagers). La plupart des diagnostics de sites ont pour objectif de mesurer les concentrations totales de polluants dans le sol, les poussières ou les végétaux. Il est alors implicitement considéré que la totalité du polluant est à même de pénétrer dans l'organisme et d'y exercer un effet toxique. Or, des études ont montré que la concentration totale d'un élément présent dans une matrice donnée n'est pas un bon indicateur du potentiel d'exposition de la population. En effet, seule la fraction biodisponible du polluant, représentative de la fraction absorbée par un organisme, est réellement assimilée par l'organisme et est susceptible d'induire un effet toxique. Or, la biodisponibilité d'un élément peut considérablement varier en fonction de la nature de la matrice (terre, poussières, eau, aliment...). Dans une démarche d'évaluation plus pertinente du risque sanitaire, disposer d'information sur la biodisponibilité orale des polluants métalliques est un atout indéniable. Ainsi, la biodisponibilité des polluants dans les différentes matrices est un paramètre clef pour l'estimation de l'exposition aux polluants. L'accès à des méthodes validées pour estimer cette biodisponibilité permettrait de proposer des préconisations plus réalistes, de réduire potentiellement le nombre de sites considérés comme dangereux, et donc, de réduire les coûts de remédiation de sites, tout en restant à un même niveau de protection sanitaire. La biodisponibilité des polluants, particulièrement en lien avec l'ingestion de particules de terre et de productions contaminées, est souvent estimée par la mesure de la bioaccessibilité orale (i.e. la fraction du contaminant extraite par les fluides digestifs) au moyen de tests in vitro. En dépit de nombreux travaux entrepris pour mesurer la bioaccessibilité, celle-ci n'est pas encore intégrée comme un outil d'évaluation des risques et de gestion des sites.

Au regard de ce constat, il apparaît indispensable de mieux intégrer la notion de biodisponibilité dans la gestion des sols contaminés. La question est toutefois de s'assurer qu'une telle intégration permettrait d'accroître la pertinence des calculs d'exposition aux polluants et ainsi, de gérer aux mieux la problématique des sols contaminés. Dans cet objectif, les différents aspects de la problématique ont été examinés dans le présent mémoire en se basant sur des illustrations issues de mes recherches qui ont porté sur l'étude de l'exposition des populations aux polluants métalliques en prenant en compte les voies d'apport suivantes : l'ingestion de particules de terre et de poussières, la consommation de denrées et l'inhalation de poussières. Les travaux que j'ai menés depuis 2008, essentiellement sur le site atelier Metaleurop, ont contribué à évaluer la disponibilité environnementale puis toxicologique et ont permis d'alimenter une réflexion plus large autour de la pertinence actuelle des méthodes utilisées pour l'évaluation et la gestion des sols pollués. Cette recherche pluridisciplinaire s'est faite dans le cadre de plusieurs partenariats à l'échelle nationale mais aussi internationale, notamment en tant que membre actif d'un groupe de recherche sur la bioaccessibilité (BARGE).

Mon projet de recherche a pour objectif de renforcer le positionnement du laboratoire sur la thématique liée à l'évaluation des risques et à la gestion sanitaire des sites contaminés, en s'intéressant notamment à d'autres polluants (en particulier organiques), à d'autres matrices telles que les sédiments et ce, en proposant de nouveaux outils chimiques et géochimiques.

AVANT-PROPOS

Ce mémoire est l'occasion de remercier de nombreuses personnes qui ont marqué ces 8 années de recherche. Les remercier bien entendu pour les échanges scientifiques et les collaborations au travers de différents programmes, mais aussi pour leurs encouragements, leurs sourires et leur bonne humeur. Cela concerne non seulement mes collègues mais également les doctorants et stagiaires qui ont participé aux travaux présentés ici.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Pascal Codron et Christophe Fachon, successivement directeurs de l'ISA, pour m'avoir accueillie au sein de l'école en tant que postdoctorante et pour m'avoir ensuite accordé leur confiance en m'embauchant en CDI. Je tiens également à remercier chaleureusement Isam Shahrour, directeur du LGCgE, pour son soutien.

Je remercie sincèrement les membres du jury pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'évaluer mon travail de recherche : Gabriel Billon, Professeur à l'Université de Lille 1, Camille Dumat, Professeur à l'INPT, Cyril Feidt, Professeur à l'Université de Lorraine, Rodolphe Gilbin, Chef de laboratoire à l'IRSN, Philippe Glorennec, Professeur à l'EHESP, et Corinne Hulot, Ingénieur d'études et de recherches à la Direction des Risques Chroniques de l'INERIS. Je remercie tout particulièrement Francis Douay, Enseignant-chercheur à l'ISA, pour m'avoir aidé à mener ce projet d'HDR jusqu'au bout, pour son soutien, sa disponibilité, ses conseils et suggestions lors de la rédaction de ce travail ainsi que pour tous nos échanges tout au long de ces 8 années au laboratoire.

Enfin, ma dernière pensée va à celui qui a tout partagé durant ces années. Merci pour tous ces moments, pour ton soutien et tes encouragements. Trouve en ces mots le témoignage de toute mon affection. Je vous dédie à toi et à Elisa ce travail.

TABLE DES MATIERES

Liste des figures	9
Liste des tableaux	12
Curriculum vitae	15
INTRODUCTION	
1. Problématique	
2. Contexte des recherches	
3. Démarche suivie	
CHAPITRE I : Comment évaluer la biodisponibilité et la bioaccessibilité des métalliques pour l'Homme ?	polluants 33
I.1. Définitions	
I.1.1. Cas de l'ingestion	
I.1.1.1. Rappel des mécanismes physiologiques de la digestion chez l'Homme	
I.1.1.2. Bioaccessibilité et biodisponibilité absolues	
I.1.1.3. Bioaccessibilité et biodisponibilité relatives	
I.1.2. Cas de l'inhalation	39
I.1.2.1. Rappel des mécanismes physiologiques de l'inhalation chez l'Homme	
I.1.2.2. Biodisponibilité et bioaccessibilité	
I.2. Mesure de la biodisponibilité et bioaccessibilité toxicologique	41
I.2.1. Cas de l'ingestion	41
I.2.1.1. Mesure de la biodisponibilité orale	
I.2.1.2. Mesure de la bioaccessibilité orale	
I.2.2. Cas de l'inhalation	46
I.2.2.1. Mesure de la biodisponibilité pulmonaire	
I.2.2.2. Mesure de la bioaccessibilité pulmonaire	47
I.3. Bioaccessibilité orale et bioaccessibilité pulmonaire : choix des tests in vitro	53
I.3.1. Bioaccessibilité orale : le test UBM	53
I.3.1.1. Description du protocole	53
I.3.1.2. Essais de répétabilité et reproductibilité	55
I.3.1.3. Paramètres sensibles du test UBM	57
I.3.2. Bioaccessibilité pulmonaire	59
I.3.2.1. Influence du milieu de dissolution sur la bioaccessibilité pulmonaire de Cd	et Pb 60
I.3.2.2. Influence du ratio solide/liquide sur la bioaccessibilité pulmonaire	61

I.3.2.3. Choix du test	62
I.4. Vers une estimation de la biodisponibilité	62
I.4.1. Théorie et principe de la mesure DGT	63
I.4.2. Caractérisation des complexes labiles	64
I.4.3. Méthodologie	65
I.4.3.1. Dispositif expérimental	65
I.4.3.2. Mesure du métal labile et total	65
I.4.4. Etude de faisabilité de l'utilisation de la DGT pour évaluer la biodisponibili l'uranium dans l'eau	té de 66
I.4.3.1. Tests de validité de la DGT en matrice simple	66
I.4.3.2. Mesures DGT : labilité de différents complexes	68
I.4.3.3. Influence de l'épaisseur du gel de la DGT sur la labilité des complexes U-L	70
I.4.5. Etude de faisabilité de l'utilisation de la DGT pour évaluer la spéciation de Cd, Zn dans les fluides gastro-intestinaux	Pb et 71
CHAPITRE II : Détermination de la bioaccessibilité des métaux dans différent matrices	entes 75
II.1. Le secteur d'étude	77
II.2. Bioaccessibilité orale des métaux dans les sols	79
II.2.1. Diagnostic de la contamination des sols sur le secteur d'étude	79
II.2.2. Influence de l'usage du sol sur la bioaccessibilité orale	81
II.2.3. Influence de la spéciation des métaux dans le sol sur la bioaccessibilité orale	83
II.2.4. Influence des paramètres physico-chimiques du sol sur la bioaccessibilité orale	87
II.2.4.1. Elaboration du modèle et validation sur les sols agricoles	87
II.2.4.2. Réponses du modèle établi sur les sols agricoles sur d'autres usages de sols situe le site atelier Metaleurop	źs sur 89
II.2.5. Influence du mode de gestion du sol sur la bioaccessibilité orale	91
II.2.5.1. Dispositifs expérimentaux	91
II.2.5.2. Evaluation des effets des modes de phytomanagement étudiés sur la bioaccess orale de Cd et Pb	bilité 92
II.3. Bioaccessibilité orale des métaux dans les légumes autoproduits	93
II.3.1. Diagnostic de la contamination des productions sur le secteur d'étude	93
II.3.2. Bioaccessibilité orale des métaux dans les légumes et influence du mode de cuisso	n 95
II.3.2.1. Cas du cadmium	95
II.3.2.2. Cas du plomb	97
II.3.2.3. Cas du zinc	99
II.3.2.4. Discussion	.101
II.4. Bioaccessibilité des métaux dans les poussières	102

II.4.2. Bioaccessibilité orale et pulmonaire des métaux dans les poussièr extérieures	es sédimentées 105
II.4.2.1. Méthodologie	105
II.4.2.2. Exposition des populations en lien avec l'ingestion de poussières	106
II.4.2.3. Exposition des populations en lien avec l'inhalation de poussières	108

III.1. Evaluation du risque en lien avec l'ingestion de particules de terre......113

CHAPITRE IV : Bilan général et perspectives 127

LISTE DES FIGURES

Introduction

Figure 1. Schéma conceptuel de la démarche suivie

Chapitre I

Figure I.1. De la concentration totale du contaminant dans la matrice étudiée à l'effet (modifié d'après la norme EN ISO 17402)
Figure I.2. Schématisation des notions de bioaccessibilité et biodisponibilité en cas d'ingestion d'une matrice contaminée
Figure I.3. Dépôt des particules inhalées dans l'appareil respiratoire selon leur taille (Prouvost et Declercq, 2007)
Figure I.4. Schématisation des notions de bioaccessibilité et biodisponibilité en cas d'inhalation de particules contaminées
Figure I.5. Représentation schématique du protocole de digestion <i>in vitro</i> UBM [54]
Figure I.6. Concentrations bioaccessibles en Cd et Pb (moyennes et écarts types en mg/kg ; $n = 3$) dans les phases G et GI mesurées dans deux échantillons de terre après extraction dans les solutions digestives conservées à 4, 20 et 37°C. *différences significatives entre les températures (ANOVA, test de Tukey, $\alpha = 5\%$) [50]
Figure I.7. Représentation schématique du protocole d'inhalation <i>in vitro</i> [52]
Figure I.8. Concentrations bioaccessibles de Cd et Pb (moyenne \pm écart type en %, n = 3) dans les échantillons certifiés pour les différents fluides pulmonaires en fonction du ratio solide/liquide. LD = limite de détection [33]
Figure I.9. Montage du dispositif DGT et représentation schématique du mécanisme de la DGT immergée en solution (d'après Tusseau-Vuillemin et al., 2003)
Figure I.10. Evolution du coefficient de diffusion D de l'uranium suivant les valeurs de pH (à 23°C) [56]
Figure I.11. Expérimentations en milieu contrôlé : conditions et paramètres mesurés. JCHESS : logiciel de spéciation (Denison et Garnier-Laplace, 2005)
Figure I.12. Proportionnalité entre la masse d'uranium accumulée dans la résine et le temps d'immersion de la cellule DGT pour les différentes expériences [56]
Figure I.13. Mesures DGT de l'uranium en matrice simple (NaNO ₃ 0,01 M, pH = 5,6) sans ligand [56]
Figure I.14. Expérimentations en milieu contrôlé en présence de ligands : conditions et paramètres mesurés
Figure I.15. Spéciation de l'uranium en présence d'ETDA (matrice NaNO ₃ 0,01 M, [U] = 400 μ g/L, [EDTA] = 1.10 ⁻⁶ et 1.10 ⁻⁵ M) [56]
Figure I.16. Mesures DGT dans une matrice simple (NaNO ₃ 0,01 M) en présence d'uranium (400 μ g/L pour EDTA, citrate et carbonates et 30 μ g/L pour phosphates) et d'un ligand (EDTA, citrate, carbonates ou phosphates à différentes concentrations) [56]
Figure I.17. Expérimentations en milieu contrôlé en présence de ligands : conditions et paramètres mesurés

Chapitre II

Figure II.15. Comparaison de la bioaccessibilité de Zn (exprimée en % des concentrations totales) dans les phases G et GI mesurée dans les pommes de terre crues, cuites à la vapeur et en friture [53]

Figure II.17. Distribution des concentrations massiques (en mg/kg) et surfaciques (en μ g/m²) en Cd et Pb dans les différentes fractions granulométriques de poussières (moyennes ± écarts types) [52] ... 104

Chapitre III

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre I

Tableau I.1. Caractéristiques gastro-intestinales chez l'enfant et chez l'adulte dans chaque compartiment [54]
Tableau I.2. Description de différents tests de mesure de la bioaccessibilité orale [54]43
Tableau I.3. Description des conditions dans chaque compartiment pour les différents tests in vitro [54]
Tableau I.4. Conditions expérimentales utilisées dans le cadre des études sur la solubilité de matériaux inhalés
Tableau I.5. Composition des solutions digestives utilisées lors des phases du test <i>in vitro</i>
Tableau I.6. Caractéristiques physico-chimiques des sols sélectionnés
Tableau I.7. Bioaccessibilité de Cd, Pb et Zn dans les phases gastrique (G) et gastro-intestinale (GI) mesurée par un même opérateur dans les sols agricoles (A, B, C) et dans les sols urbains (D, E, F) sélectionnés [22]
Tableau I.8. Bioaccessibilité de Cd, Pb et Zn dans les phases gastrique (G) et gastro-intestinale (GI)mesurée par 3 opérateurs dans les sols urbains (D, E, F et G) sélectionnés [22]56
Tableau I.9. Concentrations bioaccessibles (moyenne ± écart type exprimées en mg/kg) de Cd, Pb et Zn pour des valeurs de pH dans la phase gastrique de 1,2, 1,5 et 1,7 [20]
Tableau I.10. Caractéristiques des échantillons certifiés utilisés 59
Tableau I.11. Composition des solutions pulmonaires utilisées lors du test <i>in vitro</i>
Tableau I.12. Concentrations bioaccessibles de Cd et Pb (moyenne \pm écart type en % de laconcentration totale, n = 3) dans les échantillons certifiés pour les différents fluides pulmonaires testés(ratio S/L de 1/5000)61

Chapitre II

Tableau II.1. Distribution des concentrations totales (en mg/kg) en Cd, Pb et Zn dans les échantillons de sols étudiés sur le secteur d'étude en comparaison des teneurs agricoles habituelles régionales.... 80

 Tableau II.2. Paramètres physico-chimiques des échantillons de sols selon leurs usages (agricole, urbain, boisé)

 81

Chapitre III

Tableau III.1. Doses journalières d'exposition (<i>DJE</i> exprimées en $\mu g/kg_{pc}/j$) et quotient	de danger
(QD exprimés en mg/kg _{pc} /j) pour Cd et Pb en considérant l'enfant et l'adulte	
Tableau III.2. Quantités journalières de légumes ingérés pour l'adulte et l'enfant et taux	d'autarcie

CURRICULUM VITAE

Docteur en Sciences de la Terre de l'Université de Tours spécialité Géochimie Ingénieur en Génie Industriel de l'Environnement de l'EME de Rennes

Etat civil

Aurélie PELFRENE Née le 19 février 1980 à Deauville (Calvados) Nationalité française 157 Rue Auguste Bonte, 59130 Lambersart Pacsée – 1 enfant

Expérience professionnelle

- Depuis 2010 Ingénieur de Recherche en Toxicologie de l'Environnement au sein du Laboratoire Génie Civil et géoEnvironnement (LGCgE EA 4515) ISA Lille
- 2008-2010 Chercheur postdoctoral en Toxicologie de l'Environnement (18 mois) au sein du LGCgE-ISA Lille « Développement d'un outil de modélisation visant à mieux évaluer la biodisponibilité orale des métaux dans les sols et les risques sanitaires pour les populations vivant sur des sols fortement contaminés ». Sous la direction du Dr F. Douay.
- 2008 Chercheur postdoctoral en Ecotoxicologie (7 mois) au sein du Laboratoire de Radioécologie et d'Ecotoxicologie – IRSN Cadarache, Saint Paul les Durance « Etude de la faisabilité de l'utilisation de la DGT (Diffusive Gradient in Thin films) pour évaluer la biodisponibilité de l'uranium dans différents milieux (eau, sols, sédiment) ». Sous la direction du Pr R. Gilbin, du Dr L. Février et du Dr F. Coppin.
- 2007-2008 ATER en Géochimie à l'Université de Tours
- 2003-2004 Stage de recherche au sein de l'Unité de recherche qualité et fonctionnement hydrologique des systèmes aquatiques Cemagref, Antony Convention avec le Laboratoire National d'Hydraulique et de l'Environnement (LNHE) EDF, Chatou « Mesure du cuivre biodisponible en milieu naturel et dans les rejets de circuit de refroidissement des centrales nucléaires EDF au moyen de bryophytes et de DGT (Diffusive Gradient in Thin films) ». Sous la direction du Pr M.H. Tusseau-Vuillemin et N. Tousset.
 2003 Stage de recherche au sein du Laboratoire de Génomique Fonctionnelle des
- Cytochromes P450 IBMP (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes), CNRS, Strasbourg « Criblage fonctionnel des cytochromes P450 impliqués dans le métabolisme de pesticides ». Sous la direction du Pr D. Werck et du Dr T. Ertunc.

Formation initiale

- 2004-2008 Thèse de doctorat en Sciences de la Terre spécialité Géochimie (Bourse MRE) au sein du Laboratoire de Géologie des Environnements Aquatiques Continentaux Université de Tours
 « Spéciation des métaux traces (Cd, Cu, Pb, Zn) dans les eaux d'un Planosol non pollué (Massif Central, France) ». Sous la direction du Pr D. Grimaud et du Dr N. Gassama. Soutenue le 15 mai 2008 (Mention Très Honorable)
 2003-2004 DEA de Toxicologie de l'Environnement (Mention Bien) Université de Metz
- 2000-2003 Diplôme d'Ingénieur en Génie Industriel de l'Environnement (4^{ème} sur 68) EME (Ecole des Métiers de l'Environnement), Rennes

Responsabilités scientifiques et participation à des programmes de recherche

2015-2018 ODESSA – Appel à projets GESIPOL de l'ADEME « Optimisation de la gestion des sites et sols pollués par une mesure simple de bioaccessibilité »

Nature de l'implication dans ce projet : montage et animation du projet, réalisation de l'ensemble des expérimentations portant sur la détermination de la bioaccessibilité orale des métaux, exploitations et valorisation des résultats

2012-2015 JASSUR – Appel à projets de l'Agence Nationale de la Recherche « Jardins associatifs urbains et villes durables : pratiques, fonctions et risques »

Nature de l'implication dans ce projet : réalisation de l'ensemble des expérimentations portant sur la détermination de la bioaccessibilité orale des métaux dans les sols à l'échelle nationale

2012-2015 REPJAR – Appel à projets de l'Agence Régionale de la Santé Nord-Pas de Calais « Réduction de l'exposition aux métaux des populations en lien avec le jardinage »

Nature de l'implication dans ce projet : co-animation du projet, exploitations et valorisation des résultats

2012-2014 PoussExpo – Appel à projets de l'Agence Régionale de la Santé Nord-Pas de Calais « Les poussières extérieures : voie d'exposition aux métaux des populations »

Nature de l'implication dans ce projet : montage et animation du projet, réalisation des expérimentations, exploitations et valorisation des résultats

2011-2014 BioacLeg – Programme Recherche en Santé / Environnement – Financement Région Nord-Pas de Calais « Evaluation de l'exposition des populations en lien avec la consommation de légumes autoproduits aux alentours d'une ancienne fonderie de plomb : contribution à l'évaluation des risques sanitaires »

Nature de l'implication dans ce projet : co-animation du projet, réalisation d'une partie des expérimentations, exploitations et valorisation des résultats

2009-2013 PHYTENER – Financement ADEME

« Développement de la phytostabilisation sur des sols contaminés par des métaux à des fins énergétiques : viabilité écologique, intérêt social et bilan économique »

Nature de l'implication dans ce projet : réalisation des expérimentations portant sur la détermination de la bioaccessibilité orale des métaux dans les sols

2010-2012 BIOAC – Financement ADEME « Modélisation de la bioaccessibilité orale de Cd, Pb et Zn au regard des paramètres physico-chimiques des sols fortement contaminés : application au Nord-Pas de Calais »

Nature de l'implication dans ce projet : co-animation du projet, réalisation des expérimentations, exploitations et valorisation des résultats

2007-2011 BIOMIS – Programme Recherche en Santé / Environnement – Financement Région Nord-Pas de Calais « Identification de marqueurs influant sur la biodisponibilité des métaux lourds par la gestion de sols »

Nature de l'implication dans ce projet : co-animation du projet, réalisation des expérimentations, exploitations et valorisation des résultats

Collaborations de recherche internationales

- Membre du groupe BARGE depuis 2008 (the BioAccessibility Research Group of Europe) participation à des réunions annuelles de travail
- Collaboration avec le BGS (British Geological Survey) de Nottingham (UK) sur les tests de bioaccessibilité en lien avec l'ingestion et l'inhalation
- Collaboration avec l'université de Mendel à Brno (République Tchèque) sur le mercure dans les sols

Activités pédagogiques

Université de Lille 2

Depuis 2014 2,25 heures équivalent TD

• Master 1 Biologie Santé : Pollution des sols et impacts sur la santé : Biodisponibilité des métaux dans les sols (1,5 h CM)

ISA Lille

Depuis 2013 32 heures équivalent TD (enseignements en anglais)

• Master 1 Sustainable Management of Pollution (SMaP) : Human risk assessment (13 h CM + 20 h Etude de cas)

2012-2013 3 heures équivalent TD (enseignement en anglais)

• European Intensive Program "Pollution in Europe" à l'Institute of Chemical Technology de Prague (République Tchèque) : Human risk assessment (2 h CM)

Université de Tours

2007-2008 66 heures équivalent TD

- Licence 3 : Ecole de terrain eaux (12,5 h TP) Sortie de terrain (prélèvements d'échantillons d'eau, mesures) analyses des échantillons en salle : alcalinité, dosage Ca/Mg, dosage des orthophosphates
- IUP 1 : Ecole de terrain eaux (12,5 h TP) Sortie de terrain (prélèvements d'échantillons d'eau, mesures) analyses des échantillons en salle : alcalinité, dosage Ca/Mg, dosage des orthophosphates
- IUP 1 : Chimie des eaux (16 h CM + 8 h TD) Géochimie des eaux naturelles Différents type de réactions en phase aqueuse : réactions acido-basiques, dissolution et précipitation, oxydoréduction, réactions de complexation
- Master 2 Pro : Transferts et traitement des systèmes urbains industriels (12 h CM) Traitement des eaux usées et potabilisation

2006-2007 34 heures équivalent TD

- IUP 1 : Ecole de terrain eaux (23 h TP) Sortie de terrain (prélèvements d'échantillons d'eau, mesures) analyses des échantillons en salle (TP) : alcalinité, dosage Ca/Mg, dosage des orthophosphates
- Licence 2 : Traitement eaux déchets (24 h TP) Visites (encadrement) d'une station d'épuration, d'une station de traitement d'eau potable et d'un centre de tri
- Licence 2 : Réhabilitation des milieux pollués eaux/sols (4 h TP) Visites

2005-2006 31 heures équivalent TD

- Licence 2 : Traitement des eaux et des déchets (12 h TP) Visites (encadrement) d'une station d'épuration, d'une station de traitement d'eau potable et d'un centre de tri
- Master 1 : Evaluation de la qualité des eaux (16 h TP) Sortie de terrain (prélèvements d'échantillons d'eau, mesures) Analyses des échantillons en salle : Colorimétrie : dosage des orthophosphates / Dosage acido-basique : application à la mesure de l'alcalinité / Spectrométrie d'absorption atomique en flamme : application au dosage du calcium et du magnésium / Spectrométrie d'émission atomique en flamme : application au dosage du calcium et du magnésium / Complexométrie : application au dosage du calcium et du magnésium / Colorimétrie : dosage de la silice dissoute / Chromatographie ionique : application à l'analyse des anions Cl⁻, SO₄²⁻ et NO₃⁻
- IUP 1 : Physico-chimie des eaux (18 h TP) Analyses d'échantillons d'eau : alcalinité, dosage Ca/Mg, dosage des orthophosphates

Encadrement d'étudiants

THESE

 Co-encadrement de la thèse d'Adeline Janus (2014-2017) – Intérêt d'un amendement minéral pour remédier des sols de friches industrielles multi-contaminées en milieu urbain (bourse Région – ISA Lille)

BAC+5

- Marie Bouchez (2014) Evaluation de l'exposition des populations aux métaux en lien avec l'ingestion de particules de sols – Master 2 Diagnostic biologique des pollutions et bioremédiation Lille 1 – 6 mois
- Julie Marchand (2014) Contribution à l'évaluation des risques sanitaires en lien avec la consommation de denrées autoproduites sur des sols de potagers contaminés par une activité métallurgique Master 2 Ingénierie Statistique Numérique Lille 1 6 mois
- Anaïs Goulas (2013) Mise au point méthodologique de l'extraction et du dosage des HAP dans des sols multi-contaminés de friches industrielles – Master 2 Santé Publique Lille 2 – 6 mois

- Gwendoline Cuenca (2012) Travail préliminaire en vue de réduire l'exposition aux métaux des populations en lien avec le jardinage et la consommation de denrées autoproduites – Mémoire de fin d'études Ingénieur ISA – 6 mois
- Gaëlle Molin (2012) Intérêt de la technique DGT (Diffusive Gradient in Thin films) pour évaluer l'accumulation des métaux dans les légumes cultivés dans les potagers aux alentours de Metaleurop Nord Master 2 Santé Publique Lille 2 6 mois
- Julie Planque (2010) Contribution à l'évaluation de la contamination en plomb, cadmium et zinc des légumes produits dans des potagers autour de l'ancienne fonderie de plomb de Noyelles-Godault Mémoire de fin d'études Ingénieur ISA 6 mois

BAC +4

- Elodie Lassalle (2011) Estimation de la bioaccessibilité orale du cadmium, du plomb et du zinc, au moyen d'un modèle in vitro de digestion gastro-intestinale, en cas d'ingestion de particules de sol Master 1 Santé Publique Lille 2 3 mois
- Clémence Deville (2010) Mise au point méthodologique d'un test in vitro de digestion gastro-intestinale de légumes contaminés par des éléments traces métalliques Master 1 Environnement Lille 2 2 semaines

BAC +3

- Camille Wierzbicki (2013) Mise au point méthodologique de l'échantillonnage de poussières extérieures contaminées par des polluants métalliques Licence 3 ILIS 3 mois et demi
- Thomas Fournier (2010) Influence de la température de conservation des solutions digestives sur la bioaccessibilité orale de Cd, Pb et Zn et Impact du vieillissement de sols contaminés sur la bioaccessibilité orale de Cd, Pb et Zn et sur leur distribution 1^{ère} année Ingénieur ISA 1 mois
- Anémone Dissaux (2010) Evaluation de l'intérêt d'amendements minéraux pour la gestion durable de sols fortement contaminés par des éléments métalliques – Licence 3 ILIS – 2 mois
- Marine Gangneron (2009) Etude de l'impact du vieillissement d'échantillons de sol sur l'extractabilité chimique et le comportement de polluants métalliques (Cd, Pb, Zn) – Licence 3 ILIS – 2 mois

Accueil d'étudiants étrangers

- 2013-2014 Andrea Kleckerova, 3^{ème} année de thèse à l'Université de Mendel à Brno, République Tchèque – programme Erasmus – 4 mois en 2013, 2 semaines en 2014 et 1 semaine en 2015
- 2013 Michaela Vítková, bachelor à Institute of Chemical Technology de Prague, République Tchèque – 1 mois

Relecture d'articles scientifiques

African Journal of Environmental Science and Technology / Analytica Chimica Acta / Chemosphere / Earth Systems and Environmental Science / Environment International / Environmental Engineering and Management Journal / Environmental Geochemistry and Health / Environmental Monitoring and Assessment / Environment International / Environmental Pollution / Environmental Research / Environmental Science and Pollution Research / European Journal of Soil Science / Food and Chemical Toxicology / Human and Ecological Risk Assessment / Indoor and Built Environment / International Journal of Environmental Analytical Chemistry / International Journal of Phytoremediation / Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology / Journal of Environmental Quality / Land Degradation & Development / Regulatory Toxicology and Pharmacology / Science of the Total Environment / Transactions of the Royal Society of South Africa

Publications et travaux de recherche

Publications avec Comité de lecture

[1] Waterlot C., Douay F., <u>Pelfrêne A.</u> Chemical availability of Cd, Pb, and Zn in anthropogenically polluted soils: Assessing the geochemical reactivity and oral bioaccessibility. *Accepté dans Pedosphere*.

[2] Nsanganwimana F., Douay F., Waterlot C., <u>Pelfrêne A.</u>, Kleckerová A., Louvel B., Pourrut B. *Ex situ* growth of *Miscanthus x giganteus* reveals its potentials for phytostabilization of trace element-contaminated soils. *Soumis dans Journal of Cleaner Production*.

[3] Waterlot C., <u>Pelfrêne A.</u>, Douay F. Determining the influence of the physicochemical parameters of urban soils on As availability using chemometric methods: a preliminary study. *Journal of Environmental Sciences* http://dx.doi.org/10.1016/j.jes.2015.12.028.

[4] Heger Z., Merlos M.A.R., Krizkova S., Ruttkay-Nedecky B., Zalewska M., Planells E.M.P., <u>Pelfrene A.</u>, Pourrut B., Stiborova M., Eckschlager T., Emri G., Kizek R., Adam V., 2015. Metallothionein as a scavenger of free radicals – New cardioprotective therapeutic agent or initiator of tumor chemoresistance? *Current Drug Targets* 16, in press.

[5] Janus A., <u>Pelfrêne A.</u>, Heymans S., Deboffe C., Douay F., Waterlot C., 2015. Elaboration, characteristics and advantages of biochars for the management of contaminated soils with a specific overview on Miscanthus bioachars (Review). *Journal of Environmental Management* 162, 275-289.

[6] <u>Pelfrêne A.</u>, Waterlot C., Guerin A., Proix N., Richard A., Douay F., 2015. Use of an in vitro digestion method to estimate human bioaccessibility of Cd in vegetables grown in smelter-impacted soils: the influence of cooking. *Environmental Geochemistry and Health* 37, 767-778.

[7] <u>Pelfrêne A.</u>, Kleckerová A., Pourrut B., Nsanganwimana F., Douay F., Waterlot C., 2015. Effect of miscanthus cultivation on metal fractionation and human bioaccessibility in metal-contaminated soils: comparison between greenhouse and field experiments. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 3043-3054.

[8] <u>Pelfrêne A.</u>, Détriché S., Douay F., 2015. Combining spatial distribution with oral bioaccessibility of metals in smelter-impacted soils: Implications for human health risk assessment. *Environmental Geochemistry and Health* 37, 49-62.

[9] <u>Pelfrêne A.</u>, Waterlot C., Douay F., 2013. Influence of land use on human bioaccessibility of metals in smelter-impacted soils. *Environmental Pollution* 178, 80-88.

[10] Douay F., <u>Pelfrêne A.</u>, Planque J., Fourrier H., Richard A., Roussel H., Girondelot B., 2013. Assessment of potential risk for inhabitants living near a former lead smelter. Part 1: metal concentrations in soils, agricultural crops, and homegrown vegetables. *Environmental Monitoring and Assessment* 185, 3665-3680.

[11] <u>Pelfrêne A.</u>, Douay F., Richard A., Roussel H., Girondelot B., 2013. Assessment of potential risk for inhabitants living near a former lead smelter. Part 2: site-specific human health risk assessment of Cd and Pb contamination in kitchen gardens. *Environmental Monitoring and Assessment* 185, 2999-3012.

[12] Goulas A., <u>Pelfrêne A.</u>, Douay F., Waterlot C., 2013. Optimization of the analytical procedure of PAHs from the US EPA list using UFLC fitted with a diode array detector and Kinetex[®]-C18 column with Core-Shell particles. *Spectra Analyse* 295, 36-41.

[13] Waterlot C., Bidar G., <u>Pelfrêne A.</u>, Roussel H., Fourrier H., Douay F., 2013. Contamination, fractionation and availability of metals in urban soils in the vicinity of former lead and zinc smelters, France. *Pedosphere* 23, 143-159.

[14] Waterlot C., <u>Pelfrêne A.</u>, Douay F., 2012. Application of the high-speed self-reversal background corrector to the determination of cadmium by chemical vapor generation atomic absorption spectrometry. *Canadian Journal of Chemistry* 90, 874-879.

[15] <u>Pelfrêne A.</u>, Gassama N., 2012. Competition between particles and dissolved organic matter for trace metal binding in unpolluted soil solutions: Monitoring and thermodynamic approaches. *Bulletin de la Société Géologique de France* 183, 189-201.

[16] <u>Pelfrêne A.</u>, 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.

[17] Waterlot C., <u>Pelfrêne A</u>., Douay F., 2012. Effects of iron concentration level in extracting solutions from contaminated soils on the determination of zinc by flame atomic absorption spectrometry with background correctors. Journal of Analytical Methods in Chemistry DOI: 10.1155/2012/512709.

[18] <u>Pelfrêne A.</u>, Waterlot C., Douay F., 2011. In vitro digestion and DGT technique for estimating cadmium and lead bioavailability in contaminated soils: Influence of gastric juice pH. *Science of the Total Environment* 409, 5076-5085.

[19] <u>Pelfrêne A.</u>, Waterlot C., Douay F., 2011. Investigation of DGT as a metal speciation tool in artificial human gastrointestinal fluids. *Analytica Chimica Acta* 699, 177-186.

[20] <u>Pelfrêne A.</u>, 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.

[21] Roussel H., Waterlot C., <u>Pelfrêne A.</u>, Pruvot C., Mazzuca M., Douay F., 2010. Cd, Pb and Zn oral bioaccessibility of urban soils contaminated in the past by the atmospheric emissions of two lead and zinc smelters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 58, 945-954.

[22] <u>Pelfrêne A.</u>, Gassama N., Grimaud D., 2009. Mobility of major-, minor- and trace elements in solutions of a planosolic soil: distribution and controlling factors. *Applied Geochemistry* 24, 96-105.

[23] <u>Pelfrêne A.</u>, Gassama N., Grimaud D., 2008. Dissolved Cu(II) speciation in unpolluted soil solutions of a planosolic horizon. *Electroanalysis* 20(8), 841-850.

Communications dans des congrès et colloques

[24] Janus A., <u>Pelfrêne A.</u>, Heymans S., Deboffe C., Douay F., Waterlot C., 2015. Interest of miscanthus biochars to decrease the availability of metals and PAHs in aqueous solutions. Biochar Symposium, Geisenheim University, Germany, 28-30 September 2015.

[25] Pinte E., <u>Pelfrêne A.</u>, Détriché S., Cheppe G., Consales J.N., Schwartz C., Douay F., 2015. Metallic pollutants in Lille city (Northern France) community garden soils: contamination degrees and bioavailability. 12th Urban Environment Symposium, Oslo, Norway, 1-3 June 2015.

[26] Janus A., <u>Pelfrêne A.</u>, Douay F., Waterlot C., 2015. Intérêt d'un amendement minéral pour remédier des sols de friches industrielles multicontaminés en milieu urbain. Journée de la Recherche à l'Université Catholique de Lille, 27 mai 2015.

[27] <u>Pelfrêne A.</u>, Waterlot C., Douay F., 2014. Evaluation de l'impact de deux filières de phytomanagement sur la bioaccessibilité orale de Cd et Pb pour l'homme. 3^{ème} Rencontres Nationales de la Recherche sur les Sites et Sols pollués, ADEME, Paris, 18-19 Novembre 2014.

[28] Waterlot C., <u>Pelfrêne A.</u>, Nsanganwimana F., Pourrut B., Douay F., 2014. Evaluation des effets de *Miscanthus x giganteus* sur la distribution de Cd, Pb et Zn dans les sols contaminés d'une parcelle agricole. 3^{ème} Rencontres Nationales de la Recherche sur les Sites et Sols pollués, ADEME, Paris, 18-19 Novembre 2014.

[29] <u>Pelfrêne A.</u>, Waterlot C., Proix N., Guérin A., Richard A., Douay F., 2014. Use of an in vitro digestion method to estimate cadmium bioaccessibility in vegetables grown in smelter-impacted soils: Influence of cooking. 30th SEGH International Conference, Northumbria University, Newcastle, UK, 30th June – 4th July 2014.

[30] Détriché S., <u>Pelfrêne A.</u>, Douay F., 2014. Combining spatial distribution with oral bioaccessibility of metals in smelter-impacted soils: Implications for human health risk assessment. 30th SEGH International Conference, Northumbria University, Newcastle, UK, 30th June – 4th July 2014.

[31] <u>Pelfrêne A.</u>, Cave M., Wragg J., Mounteney I. and Burton A., 2013. Assessing bioaccessibility of metals and metalloids from reference materials for the inhalation exposure route. 7th International Workshop on Chemical Bioavailability in the Terrestrial Environment, Nottingham, Angleterre, 3-6 Novembre 2013.

[32] Goulas A., <u>Pelfrêne A.</u>, Douay F. and Waterlot C., 2013. Optimisation des conditions d'analyses des HAP en UFLC équipée d'un détecteur à barrettes de diodes et d'une colonne Kinetex®-C18. Journée de la Recherche à l'Université Catholique de Lille, 31 mai 2013.

[33] <u>Pelfrêne A.</u>, Waterlot C. and Douay F., 2012. Validation and first deployment of the DGT technique in artificial human gastrointestinal fluids after ingestion of metal-containing soil particles. SETAC Europe 22nd Annual Meeting, Berlin, Allemagne, 20-24 Mai 2012.

[34] <u>Pelfrêne A.</u>, Waterlot C., Mazzuca M., Nisse C., Bidar G. and Douay F., 2012. Bioaccessibility of Cd and Pb as affected by soil parameters in contaminated agricultural soils (northern France): A statistical modeling approach. Intersol'2012, Paris, France, 27-30 Mars 2012.

[35] <u>Pelfrêne A.</u>, Waterlot C., Nisse C., Mazzuca M. and Douay F., 2011. Assessing Cd and Pb human bioaccessibility in smelter-contaminated agricultural and urban soils (northern France). 11th International conference on the biogeochemistry of trace elements, Florence, Italy, July 3-7 2011.

[36] Waterlot C., <u>Pelfrêne A.</u> and Douay F., 2011. Lead mobility and bioaccessibility in kitchen garden soils (northern France) after immobilization with a mixture of phosphates. 11th International conference on the biogeochemistry of trace elements, Florence, Italy, July 3-7 2011.

[37] <u>Pelfrêne A.</u>, Waterlot C., Mazzuca M., Nisse C., Bidar G. and Douay F., 2009. Estimation of cadmium, lead and zinc bioavailability in smelter-contaminated soils (Northern France). Contaminated Site Management in Europe, Gent, Belgium, 27-29 October 2009.

[38] Février L., <u>Pelfrêne A.</u>, Le Moing F., Bonzom J-M., Coppin F., Motelica-Heino M. and Gilbin R., 2009. Uranium measurement by DGT: Validation of the DGT technique in simplified media and first deployment in a naturally contaminated sediment. Conference on DGT and the Environment, Santa Margherita di Pula, Sardinia, Italy, 7-9 October 2009.

[39] <u>Pelfrêne A.</u>, Gilbin R., Coppin F. and Février L., 2009. Lability of mineral and organic complexes of uranium evaluated by DGT: consequences for the use of DGT as a predictor of their bioavailability. SETAC Europe, Göteborg, Sweden, 31 May – 4 June 2009.

[40] <u>Pelfrêne A.</u>, Gassama N. and Grimaud D., 2007. Mobility of trace metals in soil solutions: speciation and controlling factors. Présentation orale à la Réunion annuelle des Sciences de la Terre – Section Géochimie des métaux lourds dans les sols - de l'Université Al.I Cuza de Iasi, Roumanie, 27 octobre 2007.

[41] <u>Pelfrêne A.</u>, Gassama N. and Grimaud D., 2007. Speciation of Cd, Cu, Pb and Zn by DPASV in unpolluted soil solutions. 17th Annual Goldschmidt Conference, Cologne, Allemagne, 19-24 août 2007.

[42] <u>Pelfrêne A.</u>, Gassama N. and Grimaud D., 2007. Mobility of major- and minor- elements and trace metals in soil solutions: distribution, speciation and controlling factors. European Geosciences Union, Vienne, Autriche, 15-20 avril 2007.

[43] <u>Pelfrêne A.</u>, Gassama N. and Grimaud D., 2006. Mobilité des métaux traces dans un sol le long d'une ligne d'écoulement d'eau : spéciation et facteurs de contrôle. Réunion des Sciences de la Terre, Dijon, 4-8 décembre 2006.

[44] Tusseau-Vuillemin M.-H., Ridame C., <u>Pelfrêne A.</u> and Tousset N., 2005. Methodology for evaluating copper bioavailability at low concentration levels: bioaccumulation in aquatic moss compared to DGT labile concentrations. SETAC Europe Annual meetings, Lille, 22-26 mai 2005.

[45] Ridame C., <u>Pelfrêne A.</u>, Tousset N. and Tusseau-Vuillemin M.-H., 2004. Copper bioaccumulation by aquatic moss in artificial and natural waters is related to labile rather than total dissolved copper concentrations. 5th European Meeting on Environmental Chemistry, Bari, Italie, 15-18 décembre 2004.

Communications orales menées dans le cadre de partenariats internationaux

[46] <u>Pelfrêne A.</u>, 2013. Oral bioaccessibility of metals. Meeting 19th June 2013, Mendel University, Brno, Czech Republic.

[47] <u>Pelfrêne A.</u>, Waterlot C., Douay F., 2011. Investigation of DGT as a metal spectiation tool in artificial human gastrointestinal fluids. BARGE meeting 4th July 2011, Florence, Italy.

[48] <u>Pelfrêne A.</u>, Waterlot C., Douay F., 2010. Oral bioaccessibility of Cd, Pb, and Zn in smelter impacted soils. BARGE meeting 20th April 2010, University of Reading, UK.

Rapports scientifiques

[49] <u>Pelfrêne A.</u>, Grard O., Heyman C., Douay F., 2015. Projet REPJAR - Réduction de l'exposition aux métaux des populations en lien avec le jardinage et la consommation de denrées autoproduites. Rapport ARS Nord-Pas de Calais, 98 pp.

[50] <u>Pelfrêne A.</u>, Mazzuca M., Douay F., 2015. Les poussières extérieures : Voie d'exposition aux métaux des populations (PoussExpo). ARS Nord-Pas de Calais, 47 pp.

[51] <u>Pelfrêne A.</u>, Waterlot C., Bidar G., Douay F., Richard A., Proix N., Guerin A., 2014. Evaluation de l'exposition des populations en lien avec la consommation de légumes autoproduits aux alentours d'une ancienne fonderie de plomb : Contribution à l'évaluation des risques sanitaires (BioacLeg). Région Nord-Pas de Calais, 45 pp.

[52] <u>Pelfrêne A.</u>, Waterlot C., Bidar G., Douay F., 2012. Identification de marqueurs influant sur la biodisponibilité de métaux lourds par ingestion de sols : BIOMIS. Région Nord-Pas de Calais, 51 pp.

[53] <u>Pelfrêne A.</u>, Waterlot C., Bidar G., Douay F., 2012. Modélisation de la bioaccessibilité orale de Cd, Pb et Zn au regard des paramètres physico-chimiques de sols fortement contaminés: Application au Nord-Pas de Calais (BIOAC). ADEME, 46 pp.

[54] Pelfrêne A., 2008. Etude de faisabilité de l'utilisation de la DGT (Diffusive Gradient in Thin films) pour évaluer la biodisponibilité de l'uranium dans différents milieux (eau, sol, sédiment). Rapport IRSN, 30 pp.

INTRODUCTION

1. Problématique

Dans les régions industrialisées, les concentrations en polluants métalliques des différents compartiments environnementaux, et notamment des sols, se sont accrues depuis de nombreuses années, au point parfois d'affecter grandement leur qualité et leurs fonctions (Commissariat général au développement durable, 2013). Ceci résulte notamment des émissions atmosphériques en lien avec les industries métallurgiques, mais aussi de l'ensemble des activités anthropiques, telles que le chauffage urbain, la circulation automobile, les remaniements, etc. A cela, s'ajoutent les pratiques agricoles avec une utilisation massive de fertilisants (inorganiques, organiques, épandages de boues de stations d'épuration) et de produits phytosanitaires qui contribuent à une contamination diffuse des sols. Cet enrichissement en polluants métalliques dans les sols est très variable dans le temps et dans l'espace et peut engendrer des risques environnementaux mais également, des risques sanitaires pour les populations, notamment celles vivant dans des environnements industriels ou ayant été affectés par le passé par des émissions atmosphériques (Mielke et Reagan, 1998 ; White et al., 1998).

Pour étudier l'exposition de l'Homme aux polluants métalliques présents dans les sols, différentes voies d'apport peuvent être prises en compte : des voies directes telles que l'ingestion de particules de terre et de poussières, l'inhalation de poussières et l'absorption cutanée, mais aussi des voies indirectes telles que la consommation de denrées autoproduites cultivées sur des sols contaminés (Hough et al., 2004). De nombreuses activités quotidiennes mettent les individus en contact avec la terre et les poussières, que ce soit à l'intérieur des habitations, mais également à l'extérieur (jardins, aires de jeux...). Les jeunes enfants (de moins de six ans) représentent le groupe de population le plus exposé du fait de raisons comportementales et physiologiques (Calabrese et al., 1989; Ruby et al., 1993; Oomen, 2000 ; Paustenbach, 2000). Les adultes sont également concernés par une exposition directe aux polluants du sol lors des loisirs et notamment lors d'activités de jardinage. L'exposition par ingestion et contact cutané est donc inévitable. Les études de santé publique prenant en compte ces voies d'exposition montrent que, pour les polluants métalliques non volatils, l'ingestion est la voie majeure. La question de la quantité de terre et de poussières ingérée est au cœur de la problématique. En France, il est considéré que la quantité moyenne ingérée quotidiennement par un enfant est de 100 mg/jour (parfois 150 mg/jour ; Dor et al., 2012) et celle ingérée par un adulte est de 50 mg/jour et peut aller jusqu'à 480 mg/jour dans le cas d'opérations de travail du sol (Hawley, 1985). Dans le cadre d'évaluations des risques, d'autres valeurs peuvent être considérées en France ou dans d'autres pays, de 20 à 200 mg/jour (Jacquet, 2007) et jusqu'à 20 g/jour lors de comportements pathologiques (comportement pica; Calabrese et al., 1997). Aussi, cette variable d'exposition peut avoir une influence notable sur le calcul de la dose d'exposition des populations en contact avec des sols pollués et entraîner des conclusions parfois préoccupantes dans les évaluations de risques (i.e. une surestimation des risques). Si de nombreux travaux ont été réalisés sur la contamination des sols et des dangers qu'elle peut présenter en lien avec la voie ingestion, c'est moins le cas pour les poussières en lien avec la voie de l'inhalation. Les poussières représentent un compartiment environnemental particulièrement complexe du fait de la diversité de leur origine, leur nature, leur degré de contamination mais aussi, du fait de leur variabilité spatiale et temporelle. Une autre caractéristique de ces poussières est leur granulométrie. En effet, le risque sanitaire est lié à la taille des particules ; plus elles sont fines et plus elles se remettent facilement en suspension. Ce sont aussi celles qui ont une capacité de fixation accrue à fixer les métaux au regard des particules les plus grossières et sont donc les plus problématiques pour la santé humaine. En effet, les fines particules peuvent pénétrer profondément dans l'appareil respiratoire, montrant ainsi l'importance de considérer la voie inhalation dans l'imprégnation (Wragg et Klinck, 2007; Broadway et al., 2010).

La gestion des sites et sols pollués est notamment motivée par la nécessité de réduire les expositions et les risques pour la santé humaine. En France, les sites et sols pollués ne font pas l'objet d'un cadre juridique spécifique mais plutôt de réglementations plus générales issues du Code de l'Environnement lesquelles s'appliquent notamment dans le contexte de la législation des installations classées (Loi n°76-663 du 19 juillet 1976) ou de la législation sur les déchets (Loi n°2003-699 du 30 juillet 2003). L'évaluation des risques sanitaires s'insère dans une démarche globale de gestion des sites et sols

pollués et consiste à effectuer une estimation de la survenue d'effets néfastes pour la santé humaine en prenant en compte la toxicité des polluants présents et l'exposition des populations à ces composés. Dans le contexte actuel, l'évaluation des risques pour l'Homme, quelle que soit la voie d'exposition considérée, reste un domaine qui est soumis à de fortes incertitudes. Les pratiques courantes reposent sur la mesure des concentrations totales en polluants. Or, des études ont montré que la concentration totale d'un élément présent dans une matrice donnée n'est pas un bon indicateur du potentiel d'exposition de la population (Freeman et al., 1994, 1996 ; Casteel et al., 1997). En effet, seule la fraction biodisponible du polluant, représentative de la fraction absorbée par un organisme, est réellement assimilée par l'organisme et est susceptible d'induire un effet toxique (Paustenbach, 2000). Or, la biodisponibilité d'un élément peut considérablement varier en fonction de la nature de la matrice (terre, poussières, eau, aliment...) (Glorennec et al., 2002). Dans le cas d'une estimation de l'exposition basée sur la concentration totale des polluants, il est implicitement considéré que la totalité du polluant est à même de pénétrer dans l'organisme et, dans le cas d'expositions directes, d'y exercer un effet toxique. Ce diagnostic conduit donc à surestimer le risque en engendrant potentiellement des mesures et des coûts excessifs en termes de gestion et de remédiation de ces sites et éventuellement à classer à tort des sites comme étant à risque. De la même manière, en cas de consommation de denrées cultivées sur des sols contaminés, l'évaluation de l'exposition aux métaux intègre la détermination : (1) de leurs concentrations dans les cultures, (2) des quantités ingérées (composition de la ration alimentaire, en fréquence et/ou en poids), (3) de l'imprégnation des personnes consommant des productions, constatée par la mesure de marqueurs biologiques d'exposition (Gzyl, 1990; Vangronsveld et al., 1994; Dudka, 1995). Néanmoins, ces données ne reflètent pas la quantité de contaminants réellement biodisponible pour l'organisme lors de l'ingestion de ces denrées. Les indices biologiques d'exposition comme les concentrations en métaux mesurées dans le sang ou l'urine peuvent en effet être liées à d'autres sources d'exposition que la seule ingestion de denrées contaminées (e.g. inhalation liée à des sources environnementales, domestiques ou professionnelles ou absorption digestive liée à l'ingestion de poussières, d'eau...). De plus, des calculs effectués pour évaluer les quantités de productions potagères ingérées montrent que celles qui accumulent le plus de métaux ne sont pas forcément celles qui participent le plus à l'imprégnation des consommateurs de par leur quantité ingérée (Gzyl, 1990). Pour poser un réel diagnostic de risques, la concentration en métaux des denrées consommées est une information importante mais reste toutefois insuffisante. Dans une démarche d'évaluation plus pertinente du risque sanitaire, disposer d'information sur la biodisponibilité orale des polluants métalliques est un atout indéniable. Ainsi, la biodisponibilité des polluants dans les différentes matrices est un paramètre clef pour l'estimation de l'exposition aux polluants. L'accès à des méthodes validées pour l'estimation de cette biodisponibilité permettrait de proposer des préconisations plus réalistes, de potentiellement réduire le nombre de sites considérés comme dangereux pour la santé des populations, et donc, de réduire les coûts de remédiation de sites, tout en restant à un même niveau de protection de la santé.

La biodisponibilité, particulièrement en lien avec l'ingestion de terres et de productions contaminées, est souvent estimée par la mesure de la bioaccessibilité orale (i.e. la fraction du contaminant extraite par les fluides digestifs) au moyen de tests *in vitro*. En dépit de nombreux travaux entrepris pour mesurer la bioaccessibilité, celle-ci n'est pas encore intégrée comme un outil d'évaluation des risques et de gestion des sites. Plusieurs raisons permettent d'expliquer l'absence de considération pour ce paramètre :

- le manque de connaissance et la difficulté de compréhension du concept. Les notions de biodisponibilité et bioaccessibilité sont souvent utilisées dans des contextes variés et n'ont pas les mêmes significations;
- la diversité et la validité des protocoles. De nombreux tests visant à déterminer la bioaccessibilité des polluants ont été développés, rendant le choix difficile pour les utilisateurs, notamment en cas d'absence de validation *in vivo*;
- la volonté en France d'avoir une approche systématiquement conservatoire pour évaluer les expositions et les risques en mesurant les concentrations totales des polluants, et qui n'intègre pas les recherches menées autour des concepts de biodisponibilité.

Au regard de ce constat, il apparaît indispensable de mieux intégrer la notion de biodisponibilité dans la gestion des sols contaminés. L'idée est de voir si une telle intégration permettrait d'accroître la pertinence des calculs d'exposition aux polluants et ainsi, de gérer aux mieux la problématique des sols contaminés. Dans cet objectif, les différents aspects sont abordés dans le présent mémoire en se basant sur des illustrations issues de mes travaux qui ont porté sur l'étude de l'exposition des populations aux polluants métalliques en prenant en compte les voies d'apport suivantes : l'ingestion de particules de terre et de poussières, la consommation de denrées et l'inhalation de poussières. Les travaux que j'ai menés permettent d'alimenter une réflexion plus large autour de la pertinence actuelle des méthodes utilisées pour l'évaluation et la gestion des sols pollués.

2. Contexte des recherches

Mes travaux de recherche s'inscrivent dans une thématique globale sur les sols qui vise à contribuer à l'évaluation des risques environnementaux et sanitaires.

Plus spécifiquement, cette thématique a débuté, lors de mon doctorat, avec l'étude de la spéciation de certains métaux traces (Cd, Cu, Pb et Zn) dans les eaux de subsurface circulant dans un sol non anthropisé de type Planosol et issu du Massif Central. L'objectif de ce travail était d'étudier, au sein de deux horizons, la distribution de Cd, Cu, Pb et Zn dans les solutions du sol et de déterminer les propriétés de complexation et d'adsorption de la matière organique et des particules minérales (oxyhydroxydes de fer, de manganèse et d'aluminium, argiles) vis-à-vis de ces métaux. Deux approches ont été couplées pour étudier la spéciation des métaux : (1) l'exploitation des données acquises sur le terrain, puis la recherche de liens avec les autres composés présents dans la solution, et (2) la détermination expérimentale de leurs affinités potentielles avec la matière organique par voltamétrie et potentiométrie afin d'acquérir des grandeurs permettant de déterminer la spéciation potentielle de ces éléments par calcul thermodynamique. Les résultats ont mis en évidence que la composition chimique des solutions du sol est principalement liée à la texture du sol (et donc à la porosité) et à l'hydrodynamique du système. Ce sont ces deux paramètres qui régulent la distribution des éléments en solution. La connaissance de leur spéciation, ainsi que des facteurs contrôlant leur mobilité, dans ce contexte non pollué, avait pour finalité de contribuer à l'évaluation du risque environnemental lié à la contamination des sols par les métaux.

Mes activités de recherche se sont poursuivies par la réalisation d'un postdoctorat au sein de l'IRSN. Il s'agissait d'étudier la faisabilité de l'utilisation de la DGT (Diffusive Gradient in Thin films) pour évaluer la biodisponibilité de l'uranium dans différentes matrices (eau, sol, sédiment). Mes travaux ont porté plus spécifiquement sur la validation de la technique DGT dans des matrices simples (eau en présence d'un gradient d'uranium dissous puis en matrice organique et inorganique artificielles). Les résultats obtenus ont permis de mener ensuite des expériences dans des solutions plus complexes (en présence de matière organique), dans des sols et des sédiments et également en comparant ces résultats à des biotests sur daphnies et/ou algues.

J'ai travaillé jusqu'à alors essentiellement sur la disponibilité environnementale de certains éléments métalliques. C'est tout naturellement que j'ai glissé vers la disponibilité toxicologique développée dans le cadre de mon second postdoctorat au sein du LGCgE-ISA Lille, laquelle fait l'objet de mes recherches depuis 2008. Plus spécifiquement, mes travaux visent à contribuer à l'évaluation de l'exposition des populations vivant sur des sites contaminés et s'inscrivent dans une thématique globale de gestion des sols mise en place dès 1994 à l'ISA Lille. Le développement de cette thématique est fortement lié au contexte environnemental du Nord – Pas de Calais, à savoir une forte urbanisation, une agriculture intensive et des dégradations environnementales liées à des activités industrielles passées particulièrement concentrées dans l'ancien bassin minier (cokeries, usines métallurgiques et chimiques...). Au regard des nombreux travaux menés au laboratoire, il a été montré sur certains secteurs de la région une contamination indéniable en Cd, Pb et Zn des sols et des poussières sédimentées et une accumulation notable des métaux dans les productions cultivées sur ces sols. Ainsi, ces problématiques ont constitué mon champ d'investigation principal pour étudier plus

spécifiquement l'exposition de la population à ces éléments, dans ces différentes matrices, en introduisant les notions de biodisponibilité/bioaccessibilité.

3. Démarche suivie

Depuis plusieurs années, une forte demande est exprimée au plan international pour développer et prendre en compte les notions de biodisponibilité / bioaccessibilité des polluants dans la gestion des sols contaminés. Avant toute chose, la compréhension et les mesures adéquates de ces paramètres sont indispensables en vue d'une meilleure évaluation de l'exposition des populations vivant sur ces sites.

Ce mémoire constitue la synthèse des recherches auxquelles j'ai contribuées depuis 2008. Comptetenu de la problématique des sites et sols pollués, mes travaux ont porté plus spécifiquement sur l'étude de l'exposition des populations aux polluants métalliques vivant sur ces sites en considérant différentes voies d'apport : l'ingestion de particules de terre et/ou de poussières, la consommation de denrées autoproduites et l'inhalation de poussières. Ma démarche scientifique s'articule autour de deux volets complémentaires (Figure 1). Le premier volet, qui se situe dans le prolongement de mon postdoctorat à l'IRSN, repose sur du développement analytique et notamment sur l'utilisation de l'outil DGT dans des matrices complexes en lien avec la biodisponibilité pour l'Homme. Le second volet est basé sur l'application de différents outils chimiques sur des sols contaminés en polluants métalliques. Mes recherches ont donc consisté à introduite les notions de biodisponibilité / bioaccessibilité des polluants métalliques en vue d'évaluer leur pertinence pour estimer *in fine* l'exposition des populations et pour proposer des pistes d'amélioration des méthodes actuelles d'évaluations des risques.

Le premier chapitre de ce mémoire présente les notions de biodisponibilité / bioaccessibilité des polluants métalliques. Il s'agit notamment d'expliciter ces notions dans le cas des sites et sols pollués, de présenter les différentes méthodes de mesures ainsi que les protocoles choisis pour mes recherches. Ce dernier point a fait l'objet de plusieurs études en vue d'améliorer les protocoles utilisés.

Le deuxième chapitre présente une application de ces notions sur un site atelier contaminé du Nord de la France et consiste en la détermination de la bioaccessibilité des polluants métalliques dans les matrices sols / légumes / poussières. Les différents aspects présentés ont été abordés en se fondant sur des illustrations issues de mes travaux qui ont permis de construire une réflexion sur les notions de biodisponibilité / bioaccessibilité et sur la compréhension des paramètres qui régissent la bioaccessibilité des polluants métalliques dans les différentes matrices étudiées.

Le troisième chapitre vise à évaluer la pertinence d'intégrer les notions de biodisponibilité et bioaccessibilité dans les études sanitaires.

Enfin, le quatrième et dernier chapitre dresse un bilan de mes travaux et introduit les axes de recherche que je souhaite développer au sein du LGCgE-ISA Lille.



Figure 1. Schéma conceptuel de la démarche suivie

CHAPITRE I

Comment évaluer la biodisponibilité et la bioaccessibilité des polluants métalliques pour l'Homme ?
I.1. Définitions

Les notions de biodisponibilité et bioaccessibilité ne sont pas définies de manière uniforme dans la littérature et, utilisées dans des contextes variés, elles n'ont pas les mêmes significations. La biodisponibilité est spécifique d'un couple « cible/contaminant » et est fonction de plusieurs paramètres tels que le temps d'exposition, le transfert du contaminant de la matrice vers les organismes, leur bioaccumulation, ainsi que leurs effets potentiels. Dans ce chapitre, ces notions ont été clarifiées au regard du récepteur humain ; on parle alors de biodisponibilité et bioaccessibilité toxicologiques (Figure I.1).

La biodisponibilité toxicologique correspond à la distribution, l'accumulation et/ou l'effet (toxique) du contaminant dans l'organisme. Selon la norme EN ISO 17402 (2011), relative à la matrice sol, « la biodisponibilité toxicologique est la concentration interne accumulée et/ou liée à un effet toxique. Cette définition se réfère aux concentrations internes chez les humains, les mammifères et autres organismes ». D'un point de vue normatif, la notion de bioaccessibilité n'apparaît pas, en tant que telle, dans la norme EN ISO 17402 mais plutôt dans la norme ISO/TS 17924 (2008) où elle est directement associée à l'organisme humain. Selon cette norme, relative à l'évaluation de l'exposition humaine par ingestion de sol et de matériau du sol, « la bioaccessibilité inclut tous les procédés physiques, chimiques et microbiologiques du corps humain, du broyage dans la bouche à la précipitation dans l'intestin ».



Figure I.1. De la concentration totale du contaminant dans la matrice étudiée à l'effet (modifié d'après la norme EN ISO 17402)

L'exposition humaine à la contamination du sol peut se faire par différentes voies directes telles que l'ingestion de particules de terre et de poussières, l'inhalation de poussières (essentiellement composées de particules/constituants du sol) et l'absorption cutanée, mais aussi par des voies indirectes *via* la chaîne alimentaire (végétaux, eau, viande). Dans ce mémoire, ont été considérées les voies ingestion et inhalation et ce, uniquement dans le cas d'une exposition de l'Homme aux contaminants métalliques ; le contact cutané n'a pas été étudié car peu significatif pour les polluants métalliques non volatils.

I.1.1. Cas de l'ingestion

I.1.1.1. Rappel des mécanismes physiologiques de la digestion chez l'Homme

Le tractus gastro-intestinal est constitué de plusieurs compartiments où la matrice ingérée va subir une série de réactions dans lesquelles la composition du fluide, le pH et le temps de résidence varient (Tableau I.1).

Tableau I.1. Caractéristiques gastro-intestinales chez l'enfant et chez l'adulte dans chaque	compartiment	[52]
--	--------------	------

Compartiments	Conditions	Enfant		Adulte				
	pH		6,2 - 7,4					
cavité buccale	temps de résidence	quelques	secondes à quelques r	ninutes				
	composition	suc s	alivaire : amy lase, mu	cus				
		1,0 à 4,0	à jeun	1,5 à 2,0				
estomac	pH	3,0 à 7,0	après ingestion de nourriture	3,0 à 7,0				
estonae	temps de résidence	2 à 4 h		1 à 4 h				
	composition	suc gastrique : l	HCl, pepsine, mucus,	lipase, uréase				
		duodénum : 4,0 - 5,5						
	pH	jéjunum : 5,5 - 7,0						
			iléum : 7,0 - 7,5					
intestin		dı	uodénum : 0,5 - 0,75 h					
Intestin	temps de résidence		jéjunum : 1,5 - 2 h					
			iléum : 5 - 7 h					
	composition	sucs intestinaux, pancréatique et biliaire : amy lase, lipase,						
	composition	trypsine, maltas	e, lactase, saccharase,	peptidase, bile				

La matrice contaminée est d'abord ingérée par la bouche où le pH y est de 6,2 à 7,4 et le temps de passage de la matrice varie de quelques secondes à quelques minutes. Les enzymes contenues dans la salive préparent les composés ingérés pour la digestion. La matrice passe à travers l'œsophage puis atteint l'estomac. Le pH de l'estomac à jeun varie de 1,0 à 4,0 suivant l'individu et lors de la digestion d'un repas, le pH monte et varie entre 3,0 et 7,0. L'introduction de la matrice dans l'estomac produit de l'acide chlorhydrique et des enzymes, ce qui entraîne une diminution du pH jusqu'à une valeur de 1,5 – 2,0. La concentration d'HCl peut atteindre 0,15 M dans l'estomac. La production d'enzymes et d'HCl entraîne la libération des contaminants de la matrice qui se dissolvent dans le fluide gastrique. Pendant ce temps, le contenu stomacal est brassé par péristaltisme. Puis, le sphincter de l'estomac s'ouvre et le bol alimentaire (ou chyme) passe dans le duodénum. L'absorption des composés dissous dans le chyme tels que les sels minéraux et/ou les polluants commence dès l'entrée dans le duodénum (il y a une faible absorption au niveau de l'estomac). La valeur du pH remonte graduellement grâce à la production de bicarbonate de soude et d'autres agents produits par le pancréas. Par la suite, l'absorption se poursuit à pH neutre ou basique lors de l'avancée du chyme dans l'intestin et le colon. Les composés sont alors absorbés et passent dans le sang ou bien sont réduits par le foie.

I.1.1.2. Bioaccessibilité et biodisponibilité absolues

Ces notions sont utilisées dans le contexte spécifique de l'ingestion par l'Homme d'une matrice contaminée. Dans le cadre de l'évaluation des risques pour la santé humaine, sont distinguées les notions de bioaccessibilité/biodisponibilité absolues et relatives (Ruby et al., 1999).

La fraction bioaccessible, ou bioaccessibilité orale d'un polluant présent dans une matrice (sol, poussières, nourriture, eau...), est la fraction de ce polluant qui est extraite de cette matrice (i.e. mise en solution) par la salive et par les fluides digestifs dans le tractus gastro-intestinal (Paustenbach,

2000). Cette fraction peut se définir comme le ratio de la quantité extraite sur la quantité ingérée. On parle de bioaccessibilité absolue car non déterminée par rapport à une référence.

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

La bioaccessibilité absolue peut prendre des valeurs allant de 0 à 100%. Lorsqu'elle est égale à 0%, aucune molécule de polluant n'est dissoute dans les fluides digestifs, tandis qu'une bioaccessibilité de 100% indique que l'ensemble de la dose administrée est dissout dans les sucs digestifs. La fraction bioaccessible correspond à la quantité maximale d'une substance ingérée disponible à l'absorption et susceptible d'engendrer un effet toxique (Figure I.2).



Figure I.2. Schématisation des notions de bioaccessibilité et biodisponibilité en cas d'ingestion d'une matrice contaminée

La fraction biodisponible, ou biodisponibilité orale d'un polluant présent dans une matrice, est la fraction de ce polluant qui atteint la circulation sanguine (ou circulation systémique) (Paustenbach, 2000; Oomen et al., 2002; Grøn et Andersen, 2003). Elle se définit comme le ratio de la quantité ayant atteint la circulation sanguine sur la quantité ingérée, c'est-à-dire le ratio de la dose absorbée sur la dose administrée (Ruby et al., 1993; Basta et Gradwohl, 2000). Comme précédemment, on parle de biodisponibilité absolue car non déterminée par rapport à une référence.

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

Tout comme la bioaccessibilité absolue, la biodisponibilité absolue peut prendre des valeurs allant de 0 à 100%. Lorsqu'elle est égale à 0%, aucune molécule de polluant n'atteint la circulation systémique (i.e. aucun effet toxique n'est attendu au niveau des organes cibles), tandis qu'une biodisponibilité de 100% signifie que l'ensemble de la dose administrée atteint la circulation sanguine (i.e. des effets toxiques sont attendus au niveau des organes cibles) (Figure I.2).

Au regard des définitions précédentes, il existe une relation entre les notions de bioaccessibilité et biodisponibilité. En effet, la biodisponibilité résulte de trois phénomènes successifs (Oomen et al., 2002; Grøn et Andersen, 2003):

• la dissolution de la substance dans la salive, les sucs stomacaux et intestinaux (fraction bioaccessible);

- l'absorption à travers l'épithélium intestinal ;
- la métabolisation hépatique.

Cette relation peut être décrite de la manière suivante :

$$F = F_B \times F_A \times F_H$$

Avec : F : fraction de la dose externe qui atteint la circulation sanguine = fraction biodisponible du contaminant

 F_B : fraction de la dose externe libérée de la matrice = fraction bioaccessible

 F_A : fraction de F_B transportée à travers l'épithélium intestinal

 F_H : fraction de F_A traversant le foie sans être métabolisée

Plus spécifiquement, la matrice contaminée est ingérée par la bouche (quantité ingérée) puis atteint ensuite l'estomac et l'intestin grêle où les polluants contenus dans celle-ci peuvent être partiellement ou totalement libérés (quantité bioaccessible). La fraction bioaccessible (F_B) correspond à la fraction de polluants extraite depuis la matrice lors de la digestion gastro-intestinale et qui se trouve ainsi dans le jus gastrique (le chyme). Cette fraction représente la quantité maximale de contaminants disponibles pouvant traverser les membranes de l'estomac et de l'intestin. La fraction absorbée (F_A), quant à elle, représente la fraction de polluants bioaccessible qui est absorbée par les membranes et qui est transportée par la veine porte dans le système sanguin. Les contaminants contenus dans le sang peuvent ensuite être métabolisés par le foie. Ainsi, la biodisponibilité orale des contaminants d'une matrice est le produit de la fraction bioaccessible, de la fraction absorbée et de la fraction non métabolisée.

La bioaccessibilité représente ainsi une étape du processus complet de biodisponibilité. La métabolisation des contaminants absorbés a lieu dans les membranes épithéliales et dans le foie. Pour la majorité des éléments métalliques, leur métabolisme dans le foie est faible. Ainsi, la fraction absorbée par l'épithélium intestinal est quasiment similaire à celle qui atteint la circulation sanguine.

I.1.1.3. Bioaccessibilité et biodisponibilité relatives

L'objectif de ces notions est de comparer l'extraction d'une substance présente sous deux formes/spéciations chimiques différentes (par exemple, le carbonate de plomb *vs* l'acétate de plomb), ou celle d'une même substance sous la même forme dans deux matrices différentes (par exemple la nourriture, le sol ou l'eau) (Ruby et al., 1993 ; Kelley et al., 2002).

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

Avec : B relative : biodisponibilité ou bioaccessibilité relative

 B_a : biodisponibilité ou bioaccessibilité dans la matrice a / sous la spéciation a (matrice testée ou forme chimique testée)

 B_b : biodisponibilité ou bioaccessibilité dans la matrice b / sous la spéciation b (matrice ou forme chimique de référence)

Tandis que la valeur de la biodisponibilité/bioaccessibilité absolue est bornée entre 0 et 100%, la biodisponibilité/bioaccessibilité relative peut prendre une valeur supérieure à 1 dans le cas où B_a est supérieure à B_b .

I.1.2. Cas de l'inhalation

I.1.2.1. Rappel des mécanismes physiologiques de l'inhalation chez l'Homme

L'appareil respiratoire peut se subdiviser en trois parties principales (Figure I.3) : le nasopharynx (partie supérieure), le segment trachéo-bronchique et le segment pulmonaire (partie inférieure). Le dépôt des particules dans le système respiratoire est fonction du diamètre des particules inhalées. Les particules de taille supérieure à 10 μ m sont captées au niveau du segment nasopharyngien puis sont évacuées par mouchage ou déglutition. Les particules inférieures à 10 μ m sont retenues par les voies aériennes supérieures, tandis que celles inférieures à 2,5 μ m et à 1 μ m pénètrent profondément dans l'appareil respiratoire (Zhang et al., 2005).



Figure I.3. Dépôt des particules inhalées dans l'appareil respiratoire selon leur taille (Prouvost et Declercq, 2007)

Le dépôt des particules dans les poumons dépend des propriétés physico-chimiques de la matrice inhalée (taille, forme, surface, caractère hygroscopique et hydrosoluble, composition chimique), mais aussi de l'anatomie de l'appareil respiratoire (Morawska et al., 2004). On distingue habituellement cinq mécanismes de dépôt (Witschger et Fabries, 2005) :

- la sédimentation liée à la gravité agissant sur les particules ;
- l'impaction inertielle caractérisée par le comportement des particules massives ;
- l'interception qui se produit lorsqu'une particule entre en contact avec une surface biologique ;
- la diffusion liée au mouvement aléatoire des particules très fines ;
- l'attraction électrostatique lorsque les particules sont chargées.

L'organisme humain dispose de différents mécanismes de défense pour éliminer les corps étrangers indésirables (Nemmar et al., 2001 ; Kreyling et al., 2002 ; Meiring et al., 2005 ; Oberdörster et al., 2002). Deux procédés sont impliqués : la translocation physique et la dissolution chimique pour les particules solubles. Par la translocation, les particules insolubles ou peu solubles déposées dans l'arbre pulmonaire sont éliminées du système respiratoire et transportées ailleurs dans l'organisme (e.g. vers le système digestif). Au niveau alvéolaire, les macrophages vont prendre en charge les particules insolubles par un mécanisme de phagocytose en vue de les digérer et les diriger vers l'ascenseur mucociliaire pour leur élimination. La prise en charge souvent incomplète des particules par les macrophages peut conduire à leur accumulation ainsi qu'à une plus grande interaction avec les cellules épithéliales des alvéoles.

Après dissolution chimique des particules solubles, ces dernières peuvent atteindre les organes extrapulmonaires via la circulation sanguine. Le devenir des particules inhalées dans le tractus respiratoire dépend donc de leur solubilité dans les fluides pulmonaires, i.e. les fluides extracellulaires et les fluides dans les macrophages alvéolaires. Les fluides pulmonaires extracellulaires sont des mélanges complexes de plusieurs composés (Gamble, 1942 ; Kanapilly, 1977 ; De Meringo et al., 1994) : (1) des surfactants constitués d'environ 90% de lipides (phospholipides comme DPPC¹) et de 10% de protéines et (2) du mucus, majoritairement aqueux (95%), contient également des lipides (1%), des glycoprotéines (mucines, 2%), des protéines (1%) et des sels inorganiques (1%). Dans les macrophages alvéolaires, les fluides lysosomaux sont caractérisés par de fortes concentrations en protéases, enzymes bactéricides (telles que lysozyme) et autres composés chimiques cytotoxiques (Brain, 1992).

I.1.2.2. Biodisponibilité et bioaccessibilité

Comme définies précédemment, les notions de biodisponibilité et bioaccessibilité sont largement répandues dans la communauté scientifique qui s'intéresse aux transferts des polluants depuis les matrices contaminées (sol, eau, nourriture...) vers les organismes (terrestres ou aquatiques, unicellulaires ou pluricellulaires, végétaux ou animaux). Toutes les définitions décrites pour la voie orale (*cf.* § ingestion) peuvent s'appliquer à la voie de l'inhalation avec comme barrière, la paroi présente au niveau des alvéoles pulmonaires. A l'origine, les notions de biodisponibilité et bioaccessibilité sont extrapolées des sciences pharmacologiques aux sciences environnementales.

Ainsi, la biodisponibilité pulmonaire est la fraction de composés qui, après avoir été inhalée, est absorbée et atteint la circulation systémique et donc, le milieu interne (Figure I.4).





Définie ainsi, la biodisponibilité intègre la solubilisation du contaminant dans les fluides pulmonaires, le transport du contaminant au travers des alvéoles pulmonaires (absorption) et pour certains contaminants, la métabolisation et son excrétion *via* les urines (Midlander et al., 2007; Wragg et Klinck, 2007). La solubilité des métaux liés aux particules inhalées dans les fluides pulmonaires est considérée comme un facteur clé dans les évaluations toxicologiques (Vousta et Samara, 2002; Niu et

¹ dipalmitoylphosphatidylcholine

al., 2010). Par exemple, Adamson et al. (2000) ont mis en évidence que la fraction de Zn soluble dans des particules atmosphériques était clairement associée à la toxicité du poumon chez la souris. Costa et Dreher (1997) ont montré une corrélation entre la fraction extraite à l'eau de Fe, V et Ni et une infection inflammatoire aigüe chez l'Homme. La solubilité des métaux peut être définie sous le terme bioaccessibilité pulmonaire qui décrit ainsi la seule fraction de polluant extraite (mise en solution) par les fluides pulmonaires (Midlander et al., 2007 ; Wragg et Klinck, 2007 ; Figure I.4).

I.2. Mesure de la biodisponibilité et bioaccessibilité toxicologique

La mesure de la biodisponibilité implique la mise en œuvre de modèles *in vivo*. Une limite importante pour utiliser cette notion dans les études d'exposition réside en la nécessité d'avoir recours à des études qui sont longues, coûteuses, difficiles à mettre en œuvre et susceptibles de poser des problèmes éthiques. C'est pourquoi, depuis plusieurs années, plusieurs groupes de recherche développent des tests *in vitro* permettant d'estimer la biodisponibilité (absolue) des contaminants métalliques et/ou organiques de manière simplifiée *via* la mesure de la bioaccessibilité (absolue). Comparés aux tests *in vivo*, ces essais sont moins onéreux, plus rapides et plus éthiques. Les essais biologiques de biodisponibilité peuvent être remplacés par des mesures chimiques de bioaccessibilité s'il a été démontré qu'elles prédisent raisonnablement la biodisponibilité des contaminants définie pour l'organisme cible spécifique et ce, dans des conditions de matrice données. Concrètement, il doit exister une corrélation linéaire suffisamment robuste permettant d'estimer la biodisponibilité (absolue) à partir d'une mesure de la bioaccessibilité (absolue) dans des solutions simulant les liquides biologiques (gastro-intestinaux et pulmonaires).

I.2.1. Cas de l'ingestion

I.2.1.1. Mesure de la biodisponibilité orale

La mesure de la biodisponibilité orale (absolue ou relative) en lien avec l'ingestion d'une matrice contaminée nécessite l'utilisation de tests *in vivo* sur des organismes vivants.

La mesure de la biodisponibilité absolue nécessite le suivi des cinétiques sanguines. La matrice contaminée est ingérée et une quantité approximativement identique est injectée par voie intraveineuse (*via* une solution où le contaminant est dissous). La concentration du contaminant dans le sang est mesurée au cours du temps et la biodisponibilité est calculée comme un ratio entre les aires sous la courbe de concentration après administration par voie orale et par intraveineuse (Grøn et Andersen, 2003). Cette technique nécessite, néanmoins, un savoir-faire expérimental de pointe et est difficile à mettre en œuvre notamment pour les polluants métalliques. En effet, certains éléments comme le cadmium ou l'antimoine ont de très faibles taux d'absorption et se trouvent donc en très faibles concentrations dans le sang, rendant ainsi leur quantification analytique difficile. Ainsi, la majorité des études *in vivo* porte sur la détermination de la biodisponibilité relative.

La mesure de la biodisponibilité relative peut être évaluée selon deux approches : les mesures d'excrétion et les mesures dans les tissus et/ou organes cibles.

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

admis que la concentration mesurée dans un compartiment cible est proportionnelle à la fraction biodisponible pour une dose d'exposition identique d'un contaminant *via* une matrice ou une forme de référence. La biodisponibilité relative est alors calculée par le rapport des doses produisant une augmentation égale de la concentration d'un contaminant donné entre la matrice étudiée et la forme de référence dans le compartiment cible étudié.

Dans la majorité des études, les modèles animaux sont utilisés pour évaluer la biodisponibilité d'un contaminant chez l'Homme. Néanmoins, une étude in vivo a été menée chez des adultes volontaires âgés de 21 à 40 ans (Maddaloni et al., 1998). Elle a été réalisée à partir d'isotopes stables de plomb afin d'évaluer la biodisponibilité de cet élément dans un sol résidentiel à proximité d'un ancien site minier. Le sol a été ingéré via des capsules de gélatine. Le sang et les urines ont été collectés puis analysés après 30 heures. Ce type d'étude reste rare et pose des problèmes éthiques évidents. Les tests in vivo chez l'animal sont donc privilégiés et sont considérés comme appropriés. Parmi les animaux utilisés se trouvent les porcs, les rats, les lapins et les singes. Des expériences ont été réalisées afin d'évaluer la fraction de métal qui atteint des organes spécifiques tels que les reins, le foie, les os et le sang après administration par voie orale sur des mammifères tels que le rat (Freeman et al., 1992), le lapin (Ruby et al., 1993), le singe (Freeman et al., 1995) et le cochon (Schroder et al., 2004). De nombreuses études ont recours au modèle porcin pour étudier la biodisponibilité des polluants métalliques dans le sol. Des différences anatomiques du système digestif sont observées entre le porc et l'Homme, cependant, la physiologie de la digestion reste globalement semblable. Le modèle primate est également considéré comme ayant une réalité physiologique et anatomique pour simuler le tractus gastro-intestinal de l'Homme et notamment de l'enfant. Néanmoins, l'expérimentation avec ce modèle est plus lourde à mettre en œuvre que pour le modèle porcin (coût des animaux plus important, contraintes spécifiques liées à leur utilisation, contraintes éthiques). Le modèle porcin, et plus spécifiquement le modèle porcelet, est le plus employé (USEPA, 2007b). Suivant le modèle animal choisi, une parfaite compréhension des mécanismes d'absorption et des éventuelles différences existantes avec l'Homme sont nécessaires. D'autres facteurs, comme l'âge des animaux, leur état nutritionnel ainsi que leur type d'alimentation, sont également à considérer.

I.2.1.2. Mesure de la bioaccessibilité orale

Dans le cadre de l'évaluation de la biodisponibilité des métaux dans les sols au regard d'une matrice de référence, de nombreux travaux ont montré que l'étape limitante est la bioaccessibilité, suivie de l'absorption. En effet, la dissolution du contaminant dans les solutions digestives est sensible aux changements de matrice et l'absorption peut s'en trouver affectée, notamment *via* des phénomènes de compétition entre les substances en présence pour le transport à travers l'épithélium intestinal (Grøn et Andersen, 2003 ; Grøn, 2005 ; Oomen et al., 2006). Dans cette optique, plusieurs groupes de recherche ont développé des tests de digestion *in vitro* permettant d'estimer la bioaccessibilité orale des contaminants d'une matrice. Ces tests ont, pour la plupart, été développés pour étudier la bioaccessibilité de contaminants inorganiques dans des sols. L'intérêt des modèles *in vitro* est de simuler partiellement les mécanismes physiologiques de la digestion humaine, en particulier les réactions physico-chimiques intervenant au niveau du système gastro-intestinal.

Depuis les années 90, différents procédés de mesure de la bioaccessibilité sont décrits dans la littérature et peuvent être regroupés en trois catégories, à savoir les tests chimiques simples, les tests physiologiques simples et les tests physiologiques avec analogues gastro-intestinaux.

• Les tests chimiques simples sont des procédés d'extraction acide (uniquement testés pour le plomb) et sont constitués d'une seule phase (la phase gastrique). Les protocoles n'utilisent que des réactifs chimiques inorganiques (principalement l'acide chlorhydrique) sans aucune mise en condition physiologique (pas de température à 37°C).

- Les tests physiologiques simples sont constitués d'une seule phase (généralement la phase gastrique) et utilisent peu de réactifs chimiques (notamment glycine, phosphate, HCl) mais une mise en condition physiologique est réalisée (température à 37°C).
- Les tests physiologiques avec analogues gastro-intestinaux sont constitués de plusieurs phases (salivaire, gastrique et/ou intestinale) et nécessitent un plus grand nombre de réactifs mais surtout des réactifs complexes correspondant à des analogues intestinaux (par exemples enzymes, sels biliaires).

Les modèles physiologiques vont de la digestion la plus simple à des modèles biochimiques très complexes. Ils diffèrent par la quantité de matrice introduite, la présence ou non d'un bol alimentaire, la prise en compte de la salive et du tractus intestinal en plus de l'estomac (certains tests prennent également en compte le colon), le temps de résidence dans chaque compartiment étudié, les composants des sécrétions gastriques et de la bile, le pH des solutions dans les différents compartiments, le type d'agitation afin de mimer le péristaltisme physiologique (rotation, va-et-vient, agitation de type péristaltique), la centrifugation ou la filtration des produits assimilés avant analyse. Les Tableaux I.2 et I.3 synthétisent les caractéristiques des principales méthodes recensées dans la littérature².

Méthodes	Туре	Compartiments simulés	pН	T (°C)	Nourriture	Ratio L/S ^(a)	Temps de résidence ^(b)	Métaux testés	Statut de validation ^(c)	
PBET	Batch	estomac	2,5	37	non	100/1	1 h	As, Pb	V/porc. singe (As Ph)	
I DEI	Baten	intestin grêle	7,0	37	non	100/1	4 h	113,10	(/ poie, singe (/ is, i b)	
SBET	Batch	estomac	1,5	37	non	100/1	1 h	As, Cd, Pb	V/porc (Pb)	
WG	Batch	estomac	1,8	37	oui	150/1	1 h	Δs	V/porc(As)	
140	Baten	intestin grêle	5,5	37	oui	150/1	1 h	745	v / poie (As)	
US P	Batch	estomac	1,0	37	non	1000/1	2 h	Pb, Cr, As, Cd, Ni	NV	
		cavité orale	6,4	37	non	160/1	5 sec			
MB & SR	Batch	estomac	2,0	37	non	2160/1	2 h	Pb, Cr, As, Cd	C / humain (Pb)	
		intestin grêle	7,5	37	non	4770/1	4 h			
		cavité orale	6,4	37	oui	15/1	0,5 h			
DIN	Batch	estomac	2,0	37	oui	50/1	2 h	As, Cd, Pb, Cr, Hg	V / porc (non publié)	
		intestin grêle	7,5	37	oui	100/1	6 h			
SUME	Batch	estomac	5,2	37	oui	2,5/1	3 h	As Cd Pb	C	
SHIVE	Batch	intestin grêle	6,5	37	oui	4/1	5 h	As, Cu, FU	C	
		cavité orale	6,5	37	non	15/1	5 min			
RIVM	Batch	estomac	1,1	37	non	37,5/1	2 h	As, Cd, Pb	С	
		intestin grêle	5,5	37	non	97,5/1	2 h			
		cavité orale	5,0	37	non	5/1	5 min			
TIM	Dynamique	estomac	2,0	37	non	30/1	1,5 h	As, Cd, Pb	С	
		intestin grêle	7,2	37	non	51/1	65			
AOAC	Batch	estomac	1,12	20	non	150/1	16 h	Cu, Zn, Mn, Fe, Al	NV	

Tableau I.2. Description de différents tests de mesure de la bioaccessibilité orale [52]

^(a) Ratio liquide/solide utilisé dans les extractions

^(b) Temps de réaction dans chaque compartiment

^(c) NV indique la non validation de la méthode par rapport à d'autres méthodes de biodisponibilité ou de bioaccessibilité

V indique que la méthode est validée par rapport à un modèle de biodisponibilité (animal ou humaine)

C indique que la méthode n'est pas validée mais comparée à d'autres tests de bioaccessibilité

- ² PBET : Physiologically Based Extraction Test (Ruby et al., 1993)
- SBET : Simplified Bioaccessibility Extraction Test (Medlin, 1997)
- IVG : In vitro Gastrointestinal Method (Rodriguez et Basta, 1999)

RIVM : RIVM in vitro Digestion Model (Sips et al., 1998)

TIM : TNO Gastrointestinal Model (Minekus et al., 1995)

US P: US Pharmacopoeia Method (Hamel et al., 1998)

MB&SR : Mass Balance & Soil Recapture method (Hamel et al., 1999)

DIN : German DIN 00 19738 (Hack et Selenka, 1996)

SHIME : Simulator of Human Microbial Ecosystem of Infants (Molly et al., 1993)

AOAC : Association Of Analytical Communities (AOAC) Pepsin Digestibility Test (Helrich, 1990)

	1		1	1 1		
		PBET	SBET	IVG	US P	MB & SR
	masse d'échantillon à analyser	400 mg	1 g	4 g	500 mg	50 mg
Cavité orale	solution salivaire	non	non	non	non	oui
Cavine orac		11011	11011	non	101	our
	volume de solution	-	-	-	-	8 mL
	pH	-	-	-	-	6.4
	temps d'incubation	-	-	-	-	5 sec
	-					
	composition	-	-	-	-	solutions organique et inorganique, mucine
Estomac	solution gastrique	oui	oui	oui	oui	oui
Lotoniate	volumo de solution	40I	100	600I	50 ml	100I
		40 IIL	TOO IIIL	800 IIIL	50 mL	100 IIL
	pH	2.5	1.5	1.8	1.2	2.0
	temps d'incubation	16	lb	16	2h	26
	temps d incubation	111	111	III	211	20
	composition	pepsine, citrate, malate, acide lactique, acide acétique	glycine	pepsine, NaCl	NaCl, HCl, pepsine	NaCl, HCl, pepsine
Intestin	solution intestinale	oui	non	oui	non	oui
	volumo de actueiro	40		40 ml		100
	volume de solution	40 ML	-	40 mL	-	100 mL
	pH	7.0	-	5.5	-	7.5
	temps d'incubation	4h	-	lh	-	4h
	composition	pancréatine, bile	-	pancréatine, extrait de bile	-	bicarbonate de sodium
	centrifugation	oui	non	oui	oui	oui
	filtration	non	oui	oui	non	oui
		DIN	SHIME	DIVM	TIM	1010
		DIN	SHIME	RIVM	TIM	AOAC
	masse d'échantillon à analyser	DIN 2 g	SHIME 10 g	RIVM 0,6 g	TIM 10 g	AOAC 100 mg
Cavité orale	masse d'échantillon à analyser solution salivaire	DIN 2 g non	SHIME 10 g non	RIVM 0,6 g oui	TIM 10 g oui	AOAC 100 mg non
Cavité orale	masse d'échantillon à analyser solution salivaire volume de solution	DIN 2g non	SHIME 10 g non -	RIVM 0,6 g oui 9 mL	TIM 10 g oui 50 mL	AOAC 100 mg non
Cavité orale	masse d'échantillon à analyser solution salivaire volume de solution nH	DIN 2g non	SHIME 10 g non -	RIVM 0,6 g oui 9 mL 65	TTM 10 g oui 50 mL 50	AOAC 100 mg non
Cavité orale	masse d'échantillon à analyser solution salivaire volume de solution pH taurer d'insultation	DIN 2g non -	SHIME 10 g non - -	RIVM 0,6 g oui 9 mL 6.5 6 crim	TTM 10 g oui 50 mL 5.0	AOAC 100 mg non -
Cavité orale	masse d'échantillon à analyser solution salivaire volume de solution pH temps d'incubation	DIN 2 g non - -	SHIME 10 g non - - -	RIVM 0,6 g oui 9 mL 6,5 5 min	TIM 10 g oui 50 mL 5.0 5 min	AOAC 100 mg non - -
Cavité orale	masse d'échantillon à analyser solution salivaire volume de solution pH temps d'incubation composition	DIN 2g non - - - -	SHIME 10 g non - - - -	RIVM 0,6 g oui 9 mL 6.5 5 min solutions organique et inorganique, amylase, acide urique, mucine	TTM 10 g oui 50 mL 5.0 5 min non spécifié	AOAC 100 mg - - - -
Cavité orale Estomac	masse d'échantillon à analyser solution salivaire volume de solution pH temps d'incubation composition solution gastrique	DIN 2 g non - - - - -	SHIME 10 g non - - - - oui	RIVM 0,6 g oui 9 mL 6.5 5 min solutions organique et inorganique, anylase, acide urique, mucine oui	TIM 10 g oui 50 mL 5.0 5 min non spécifié oui	AOAC 100 mg - - - - - -
Cavité orale Estomac	masse d'échantillon à analyser solution salivaire volume de solution pH temps d'incubation composition solution gastrique volume de solution	DIN 2 g non - - - - - - 0ui	SHIME 10 g non - - - - - oui 25 ml	RIVM 0,6 g oui 9 mL 6.5 5 min solutions organique et inorganique, amy lase, acide urique, mucine oui	TIM 10 g oui 50 mL 5.0 5 min non spécifié oui 250 ml	AOAC 100 mg - - - - oui 15 ml
Cavité orale Estomac	masse d'échantillon à analyser solution salivaire volume de solution pH temps d'incubation composition solution gastrique volume de solution	DIN 2 g non - - - - - 000 mL 200	SHIME 10 g non - - - oui 25 mL 4 2	RIVM 0,6 g oui 9 mL 6.5 5 min solutions organique et inorganique, amylase, acide urique, mucine oui 13,5 mL	TTM 10 g oui 50 mL 5.0 5 min non spécifié oui 250 mL	AOAC 100 mg - - - - oui 15 mL
Cavité orale Estomac	masse d'échantillon à analyser solution salivaire volume de solution pH temps d'incubation composition solution gastrique volume de solution pH	DIN 2 g non - - - - - - 0ui 100 mL 2.0	SHIME 10 g non - - - - oui 25 mL 4.0	RIVM 0,6 g oui 9 mL 6.5 5 min solutions organique et inorganique, amylase, acide urique, mucine oui 13,5 mL 1.1	TTM 10 g oui 50 mL 5.0 5 min non spécifié oui 250 mL pH initial de 5,0 puis	AOAC 100 mg - - - - - oui 15 mL 1.1
Cavité orale Estomac	masse d'échantillon à analyser solution salivaire volume de solution pH temps d'incubation composition solution gastrique volume de solution pH temps d'incubation	DIN 2 g non - - - - - 0ui 100 mL 2.0 2h	SHIME 10 g non - - - - oui 25 mL 4.0 3h	RIVM 0.6 g oui 9 mL 6.5 5 min solutions organique et inorganique, amylase, acide urique, mucine oui 13,5 mL 1.1 2h	TIM 10 g oui 50 mL 5.0 5 min non spécifié oui 250 mL pH initial de 5,0 puis diminution jusqu'à 3,5-2,5- 2,0 après 30-60-90 min	AOAC 100 mg - - - - oui 15 mL 1.1 16h
Cavité orale Estomac	masse d'échantillon à analyser solution salivaire volume de solution pH temps d'incubation composition solution gastrique volume de solution pH temps d'incubation composition	DIN 2 g non - - - oui 100 mL 2.0 2h solutions organique et inorganique, pepsine, mucine	SHIME 10 g non - - - oui 25 mL 4.0 3h pectine, mucine, cellobiose, protéose-peptone	RIVM 0,6 g oui 9 mL 6.5 5 min solutions organique et inorganique, amylase, acide urique, mucine oui 13,5 mL 1.1 2h solutions organique et inorganique, pepsine, mucine, sérum albumine bovin	TTM 10 g oui 50 mL 5.0 5 min non spécifié oui 250 mL pH initial de 5,0 puis diminution jusqu'à 3,5-2,5- 2,0 après 30-60-90 min solutions organique et inorganique, lipase, pepsine	AOAC 100 mg non - - - oui 15 mL 1.1 16h pepsine
Cavité orale Estomac	masse d'échantillon à analyser solution salivaire volume de solution pH temps d'incubation composition solution gastrique volume de solution pH temps d'incubation composition solution intestinale	DIN 2 g non - - - oui 100 mL 2.0 2h solutions organique et inorganique, pepsine, mucine oui	SHIME 10 g non - - - oui 25 mL 4.0 3h pectine, mucine, cellobiose, protéose-peptone	RIVM 0,6 g oui 9 mL 6.5 5 min solutions organique et inorganique, amylase, acide urique, mucine oui 13,5 mL 1.1 2h solutions organique et inorganique, pepsine, mucine, sérum albumine bovin oui	TTM 10 g oui 50 mL 5.0 5 min non spécifié oui 250 mL pH initial de 5,0 puis diminution jusqu'à 3,5-2,5- 2,0 après 30-60-90 min solutions organique et inorganique, lipase, pepsine oui	AOAC 100 mg non - - - oui 15 mL 1.1 16h pepsine non
Cavité orale Estomac	masse d'échantillon à analyser solution salivaire volume de solution pH temps d'incubation composition solution gastrique volume de solution pH temps d'incubation composition solution intestinale	DIN 2 g non - - - oui 100 mL 2.0 2h solutions organique et inorganique, pepsine, mucine oui	SHIME 10 g non - - - oui 25 mL 4.0 3h pectine, mucine, cellobiose, protéose-peptone	RIVM 0.6 g oui 9 mL 6.5 5 min solutions organique et inorganique, amylase, acide urique, mucine oui 13,5 mL 1.1 2h solutions organique et inorganique, pepsine, mucine, sérum albumine bovin oui solution duodénale 27 mL	TIM 10 g oui 50 mL 5.0 5 min non spécifié oui 250 mL pH initial de 5,0 puis diminution jusqu'à 3,5-2,5- 2,0 après 30-60-90 min solutions organique et inorganique, lipase, pepsine oui duodénum-jéjunum-iléum	AOAC 100 mg non - - - oui 15 mL 1.1 16h pepsine non
Cavité orale Estomac	masse d'échantillon à analyser solution salivaire volume de solution pH temps d'incubation composition solution gastrique volume de solution pH temps d'incubation composition solution intestinale volume de solution	DIN 2 g non - - - oui 100 mL 2.0 2h solutions organique et inorganique, pepsine, mucine oui 100 mL	SHIME 10 g non - - - oui 25 mL 4.0 3h pectine, mucine, cellobiose, protéose-peptone	RIVM 0,6 g oui 9 mL 6,5 5 min solutions organique et inorganique, amylase, acide urique, mucine oui 13,5 mL 1.1 2h solutions organique et inorganique, pepsine, mucine, sérum albumine bovin oui solution duodénale 27 mL solution biliaire 9 mL	TIM 10 g oui 50 mL 5.0 5 min non spécifié oui 250 mL pH initial de 5,0 puis diminution jusqu'à 3,5-2,5- 2,0 après 30-60-90 min solutions organique et inorganique, lipase, pepsine oui duodénum-jéjunum-iléum 3x70 mL	AOAC 100 mg non - - - oui 15 mL 1.1 16h pepsine non -
Cavité orale Estomac	masse d'échantillon à analyser solution salivaire volume de solution pH temps d'incubation composition solution gastrique volume de solution pH temps d'incubation composition solution intestinale volume de solution pH	DIN 2 g non - - - oui 100 mL 2.0 2h solutions organique et inorganique, pepsine, mucine oui 100 mL 7.5	SHIME 10 g non - - - oui 25 mL 4.0 3h pectine, mucine, cellobiose, protéose-peptone oui 15 mL 6.5	RIVM 0,6 g oui 9 mL 6.5 5 min solutions organique et inorganique, amylase, acide urique, mucine oui 13,5 mL 1.1 2h solutions organique et inorganique, pepsine, mucine, sérum albunine bovin oui solution duodénale 27 mL solution duodénale 7.8 solution duodénale 7.8 solution biliaire 8,0 mélange 5,5	TIM 10 g oui 50 mL 5.0 5 min non spécifié oui 250 mL pH initial de 5,0 puis diminution jusqu'à 3,5-2,5- 2,0 après 30-60-90 min solutions organique et inorganique, lipase, pepsine oui duodénum-jéjunum-iléum 3x70 mL duodénum 6,5 jéjunum 6,8 iléum 7,2	AOAC 100 mg non - - - oui 15 mL 1.1 16h pepsine non - -
Cavité orale Estomac	masse d'échantillon à analyser solution salivaire volume de solution pH temps d'incubation composition solution gastrique volume de solution pH temps d'incubation composition solution intestinale volume de solution pH temps d'incubation	DIN 2 g non - - - oui 100 mL 2.0 2h solutions organique et inorganique, pepsine, mucine oui 100 mL 7.5 6h	SHIME 10 g non - - - oui 25 mL 4.0 3h pectine, mucine, cellobiose, protéose-peptone oui 15 mL 6.5 Sh	RIVM 0,6 g oui 9 mL 6.5 5 min solutions organique et inorganique, anylase, acide urique, mucine oui 13,5 mL 1.1 2h solutions organique et inorganique, pepsine, mucine, sérum albumine bovin oui solution duodénale 27 mL solution biliaire 9 mL solution duodénale 7.8 solution biliaire 8,0 mélange 5,5 2h	TIM 10 g oui 50 mL 5.0 5 min non spécifié oui 250 mL pH initial de 5,0 puis diminution jusqu'à 3,5-2,5- 2,0 après 30-60-90 min solutions organique et inorganique, lipase, pepsine oui duodénum-jéjunum-iléum 3x70 mL duodénum 6,5 jéjunum 6,8 iléum 7,2 6h	AOAC 100 mg non - - - oui 15 mL 1.1 16h pepsine non - -
Cavité orale Estomac	masse d'échantillon à analyser solution salivaire volume de solution pH temps d'incubation composition solution gastrique volume de solution pH temps d'incubation solution intestinale volume de solution pH temps d'incubation pH temps d'incubation	DIN 2 g non - - - oui 100 mL 2.0 2h solutions organique et inorganique, pepsine, mucine Oui 100 mL 7.5 6h solutions organique et inorganique, trypsine, pancréatine, bile	SHIME 10 g non - - - oui 25 mL 4.0 3h pectine, mucine, cellobiose, protéose-peptone oui 15 mL 6.5 5h pancréatine	RIVM 0,6 g oui 9 mL 6,5 5 min solutions organique et inorganique, anylase, acide urique, mucine oui 13,5 mL 1.1 2h solutions organique et inorganique, pepsine, mucine, sérum albumine bovin oui solution duodénale 27 mL solution duodénale 7,8 solution biliaire 8,0 mélange 5,5 2h solutions organiques et inorganique, CaCl ₂ , pancréatine, lipase, sérum albumine bovin, bile	TIM 10 g oui 50 mL 5.0 5 min non spécifié oui 250 mL pH initial de 5,0 puis diminution jusqu'à 3,5-2,5- 2,0 après 30-60-90 min solutions organique et inorganique, lipase, pepsine oui duodénum-jéjunum-iléum 3x70 mL duodénum 6,5 jéjunum 6,8 iléum 7,2 6h solutions organique et inorganique, pancréatine, bile	AOAC 100 mg non - - - oui 15 mL 1.1 16h pepsine non - - - - - - - - - - - - -
Cavité orale Estomac Intestin	masse d'échantillon à analyser solution salivaire volume de solution pH temps d'incubation composition solution gastrique volume de solution pH temps d'incubation solution intestinale volume de solution pH temps d'incubation pH temps d'incubation	DIN 2 g non - - - oui 100 mL 2.0 2h solutions organique et inorganique, pepsine, mucine oui 100 mL 7.5 6h solutions organique et inorganique, trypsine, pancréatine, bile	SHIME 10 g non - - - oui 25 mL 4.0 3h pectine, mucine, cellobiose, protéose-peptone oui 15 mL 6.5 5h pancréatine	RIVM 0.6 g oui 9 mL 6.5 5 min solutions organique et inorganique, anylase, acide urique, mucine oui 13,5 mL 1.1 2h solutions organique et inorganique, pepsine, mucine, sérum albumine bovin oui solution duodénale 27 mL solution biliaire 9 mL solution biliaire 9 mL solution biliaire 9 mL solution biliaire 8,0 mélange 5,5 2h solutions organique, caCl ₂ , pancréatine, lipase, sérum albumine bovin, bile	TIM 10 g oui 50 mL 5.0 5 min non spécifié 0ui 250 mL pH initial de 5.0 puis diminution jusqu'à 3,5-2,5- 2,0 après 30-60-90 min solutions organique et inorganique, lipase, pepsine 0ui duodénum-jéjunum-iléum 3x70 mL duodénum 6,5 jéjunum 6,8 iléum 7,2 6h solutions organique et inorganique, pancréatine, bile	AOAC 100 mg non - - - oui 15 mL 1.1 16h pepsine non - - - - -
Cavité orale Estomac Intestin	masse d'échantillon à analyser solution salivaire volume de solution pH temps d'incubation composition solution gastrique volume de solution pH temps d'incubation composition solution intestinale volume de solution pH temps d'incubation composition composition	DIN 2 g non - - - oui 100 mL 2.0 2h solutions organique et inorganique, pepsine, mucine oui 100 mL 7.5 6h solutions organique et inorganique, trypsine, pancréatine, bile oui	SHIME 10 g non - - - oui 25 mL 4.0 3h pectine, mucine, cellobiose, protéose-peptone oui 15 mL 6.5 5h pancréatine oui	RIVM 0,6 g oui 9 mL 6,5 5 min solutions organique et inorganique, amylase, acide urique, mucine oui 13,5 mL 1.1 2h solutions organique et inorganique, pepsine, mucine, sérum albumine bovin oui solution duodénale 27 mL solution biliaire 9 mL solution biliaire 9 mL solution biliaire 8,0 mélange 5,5 2h solutions organiques et inorganique, cAC2, pancréatine, lipase, sérum albumine bovin, bile oui	TIM 10 g oui 50 mL 5.0 5 min non spécifié 0ui 250 mL pH initial de 5,0 puis diminution jusqu'à 3,5-2,5- 2,0 après 30-60-90 min solutions organique et inorganique, lipase, pepsine 0ui duodénum-jéjunum-iléum 3x70 mL duodénum 6,5 jéjunum 6,8 iléum 7,2 6h solutions organique et inorganique, pancréatine, bile	AOAC 100 mg non - - - oui 15 mL 1.1 16h pepsine non - - - - non

Tableau I.3. Description des conditions dans chaque compartiment pour les différents tests in vitro [52]

Plusieurs méthodes sont basées sur des techniques d'extraction similaires incluant différents compartiments (cavité buccale, phases gastrique et intestinale). Il semblerait que le compartiment de la cavité buccale ait un faible effet sur la bioaccessibilité finale. Dans certains tests (DIN), cette étape est optionnelle. Dans certaines méthodes, seule la teneur finale du contaminant après extraction est déterminée. Oomen et al. (2002) ont souligné les désavantages de cette technique. En effet, avec seulement un échantillon récupéré à l'étape finale, il n'est pas possible de mettre en évidence d'éventuels changements de la concentration en contaminant au cours des étapes précédentes. Par

exemple, dans la phase gastrique, le pH est faible tandis que dans la phase intestinale, le pH est beaucoup plus fort. Ainsi, la concentration de certains éléments pourra être plus importante dans l'estomac que dans l'intestin où des réactions de précipitation peuvent se produire (Ruby et al., 1996). C'est le cas du test SBET (une seule étape) qui donne des valeurs de bioaccessibilité du plomb plus fortes que dans des tests à plusieurs étapes. Dans le cas d'une évaluation de risques, il est plus approprié d'estimer la bioaccessibilité dans les deux compartiments.

Dans une étude comparant cinq méthodes de bioaccessibilité, Oomen et al. (2002) concluent sur le fait que le pH est probablement le facteur qui a le plus d'influence sur le résultat final. Dans les différentes solutions, les valeurs de pH sont ajustées suivant les valeurs physiologiques de l'Homme. Dans la cavité buccale, le pH peut varier de 6,2 à 7,4 (Guyton et al., 1991 ; Kedjarune et al., 1997). Pour le compartiment stomacal, il est difficile de choisir un pH approprié car le pH gastrique varie d'un individu à l'autre (enfants : de 1,0 à 4,0 ; Anderson et al., 1999, adultes : de 1,5 à 2,0 ; Charman et al., 1997) et dépend également de l'état nutritionnel. Après ingestion de nourriture, le pH gastrique augmente de 3,0 à 7,0 (Dressman et al., 1990 ; Charman et al., 1997). Il est également difficile de choisir une valeur de pH pour la solution intestinale, car celui-ci passe de 4,5 dans le duodénum à 7,5 dans l'iléum (Daugherty et Mrsny, 1999). Une valeur de pH faible dans la phase gastrique entraîne des valeurs de bioaccessibilité plus importantes. Il est plus judicieux de ne pas considérer les méthodes qui nécessitent de travailler dans des conditions de pH trop fort ou trop faible dans la phase gastrique. Les méthodes US P et MS&SR utilisent trop d'acide chlorhydrique et ne sont donc pas représentatives des conditions physiologiques (Ruby et al., 1999). Au contraire, dans la méthode SHIME, le pH est trop élevé (pH= 5,2) (Oomen et al., 2002).

En considérant l'ensemble des tests présentés, le ratio L/S (liquide/solide) varie de 2,5/1 à 5000/1 (Tableaux I.2 et I.3). Hamel et al. (1998) montrent que le choix du ratio n'est pas un facteur important. Néanmoins, il est préférable de travailler dans des conditions représentatives du système gastro-intestinal d'un enfant, soit un ratio 100/1 d'après Ruby et al. (1996).

Les temps de résidence sont en moyenne de 2 et 4,5 h respectivement dans l'estomac et l'intestin (Tableaux I.2 et I.3), ce qui correspond à la gamme de valeurs pour un enfant âgé de 2-3 ans (Ruby et al., 1996). Par contre, dans la méthode AOAC, le temps de résidence dans l'estomac est de 16 h. Ce test est basé sur la physiologie du poisson et est difficilement applicable dans une évaluation de risque pour l'homme. Il y a très peu d'informations dans la littérature concernant la sensibilité des tests vis-à-vis des temps de résidence. Néanmoins, il semblerait que ce paramètre ait un léger effet sur les valeurs de bioaccessibilité obtenues.

Certaines méthodes introduisent un bol alimentaire dans le mélange d'extraction pour évaluer son effet sur les mesures de bioaccessibilité. Du lait en poudre (Molly et al., 1993) ou de la nourriture sous forme de pâte (Rodriguez et Basta, 1999) ont été testés. Le choix et la quantité de nourriture introduite pourrait potentiellement avoir un effet significatif sur les mesures de bioaccessibilité, par exemple un changement de pH ou la formation d'un revêtement sur les particules de sol. D'un point de vue d'évaluation de risque, certains auteurs montrent que la présence de nourriture augmente la bioaccessibilité de certains éléments (Rodriquez et Basta, 1999 ; Oomen et al., 2002). Maddaloni et al. (1998) ont conclu à une diminution de la bioaccessibilité du plomb en condition nourrie en travaillant sur un modèle humain. Néanmoins, plusieurs paramètres peuvent être pris en compte (variété de nourriture) rendant ces études assez complexes. La présence de nourriture augmente la capacité de complexation du chyme et ainsi la mobilisation des contaminants du sol (Oomen, 2000). Dans le cadre d'une évaluation de risques, un choix doit être fait : soit les valeurs de bioaccessibilité sont déterminées en se plaçant dans le cas le plus défavorable (i.e. à jeun, pH gastrique faible), soit dans un cas plus réaliste (i.e. nourri ou semi-nourri, pH gastrique plus important).

Des échantillons sont prélevés après les différentes grandes étapes de digestion mises en œuvre afin d'évaluer une bioaccessibilité gastrique et une bioaccessibilité intestinale. De manière générale, les

résultats issus des tests *in vitro* sont exprimés par la fraction bioaccessible (*FB*) en % selon l'équation suivante :

$$FB (\%) = \frac{[Elément]_{bioaccessible}}{[Elément]_{total}} \times 100$$

Avec : [Elément]_{bioaccessible} : concentration en élément extrait après la phase gastrique ou intestinale [Elément]_{total} : concentration en élément présent initialement dans la matrice

Les concentrations en élément bioaccessible sont aussi exprimées en mg/kg de matières sèches (MS). Ces tests permettent de déterminer la bioaccessibilité absolue des contaminants dans une matrice donnée. La bioaccessibilité relative peut ensuite être calculée en référence, par exemple, à un autre sol (témoin) ou une autre matrice (Schroder et al., 2004 ; Hagens et al., 2008).

Les essais *in vitro* ont été développés afin de fournir une mesure de substitution de la biodisponibilité. Tous les protocoles présentés précédemment présentent des avantages et des inconvénients. La validation par rapport à des tests *in vivo* est un facteur très important même si les différences physiologiques entre l'animal et l'Homme doivent être prises en compte. La facilité d'utilisation d'un test doit également être une considération importante, particulièrement lorsque de nombreux échantillons doivent être analysés.

Pour un même polluant dans un même type de sol, la bioaccessibilité mesurée peut varier en fonction des protocoles mis en œuvre, et ceci dans des proportions parfois importantes. Les résultats ainsi obtenus ne sont généralement pas comparables et ceci, étant donné les différences existantes entre les tests (Oomen et al., 2002 ; Saikat et al., 2007 ; van de Wiele et al., 2007). La température (37°C) est majoritairement le seul paramètre commun aux différents tests *in vitro*. Plusieurs facteurs importants ont été identifiés comme ayant une influence dans le comportement des tests de bioaccessibilité (Oomen et al., 2002 ; Morrison et Gulson, 2007 ; USEPA, 2007a). Ces facteurs sont : le type d'agitation, le temps de digestion, la présence de nourriture, le pH de la digestion, la taille des particules, le ratio liquide/solide, la composition des solutions digestives (Ruby et al., 1996 ; Rodriguez et Basta, 1999 ; Sips et al., 2001 ; Oomen et al., 2002 ; USEPA, 2007b).

I.2.2. Cas de l'inhalation

I.2.2.1. Mesure de la biodisponibilité pulmonaire

La plus grande complexité de l'anatomie pulmonaire comparée au tractus intestinal et le nombre relativement faible de molécules administrées par voie pulmonaire commercialisées limitent les données de pharmacocinétiques *in vivo*, ce qui explique l'absence de modèle *in vitro* pulmonaire reconnu par les instances réglementaires. Il existe encore aujourd'hui un manque de connaissance sur la compréhension des mécanismes d'absorption de molécules au niveau pulmonaire. Un nombre croissant de modèles d'épithéliums pulmonaires a émergé ces dernières décennies, aidant à la compréhension des mécanismes structurels, cellulaires et moléculaires ou à la découverte des phénomènes de régulation mis en jeu au niveau pulmonaire.

La mesure de la biodisponibilité pulmonaire est réalisée le plus souvent sur des animaux (souvent des rongeurs) et consiste à étudier la réponse inflammatoire du poumon en réalisant une instillation intratrachéale de particules contaminées. Les méthodes *in vivo* présentent l'avantage d'observer directement les réactions des organismes vivant exposés à des composés toxiques et de mesurer le polluant d'intérêt dans les tissues pulmonaires, le sang mais également dans les urines afin d'étudier sa cancérogénicité (Buchet et al., 1995 ; Goodman et al., 2011 ; Drysdale et al., 2012).

Les études *in vivo* chez l'Homme utilisent des biomarqueurs de toxicité qui sont des outils très efficaces dans l'évaluation et la surveillance des risques pour la santé des composés chimiques de l'environnement. En médecine clinique, les biomarqueurs de toxicité pulmonaire nécessitent un lavage broncho-pulmonaire, procédé difficile à mettre en œuvre dans le cadre d'une surveillance de

populations à risque, que ce soit dans l'industrie ou l'environnement. Pour pallier cette difficulté, certains biomarqueurs peuvent être appliqués directement sur le sérum. Il s'agit notamment d'une microprotéine, la protéine 1 ou Clara Cell Protein (CC16), sécrétée dans le tractus respiratoire par les cellules de Clara non ciliées, connues pour leur vulnérabilité aux expositions toxiques. Des études ont suggéré que la CC16 sérique pouvait être un test relativement spécifique pour détecter des effets précoces à des polluants atmosphériques sur l'arbre trachéobronchique.

En vue de pallier la complexité des études *in vivo*, leur problème d'éthique et le manque de réalisme pour certaines extrapolations animal/homme, de nombreuses études ont été réalisées pour développer des tests *in vitro* afin de déterminer la bioaccessibilité des substances toxiques issus de matières particulaires. Ces approches ont également été largement utilisées dans le domaine pharmaceutique (Davies et Feddah, 2003 ; Arora et al., 2010 ; Copley et al., 2010 ; Son et al., 2010 ; Riley et al., 2012).

I.2.2.2. Mesure de la bioaccessibilité pulmonaire

De nombreux matériaux naturels et anthropiques sont reconnus pour influencer la santé humaine. Aussi, depuis les quinze dernières années, de nombreuses approches *in vitro* ont été étudiées afin d'évaluer leur solubilité (i.e. la bioaccessibilité) lors de leur inhalation. Parmi ces matériaux se trouvent principalement (Plumlee and Ziegler, 2003) :

- les poussières minérales, la silice, le charbon et autres minéraux fibreux issus des roches naturelles et des activités anthropiques (extraction minière, industries, activités de construction et démolition);
- les déchets solides, gazeux, aqueux issus des activités minières, industrielles...;
- les matériaux de construction tels que ciment, béton, agrégats, fibres minérales et de verre, gypse ;
- les poussières et les particules de sol chargées en polluants métalliques, organiques ou pathogènes ;
- les cendres volcaniques et gaz.

De nombreuses maladies et problèmes de santé sont associés à l'exposition des différents éléments trouvés dans ces matériaux (e.g. asbestose, silicose, cancer du poumon, bronchite industrielle, fibrose, irritation de la trachée respiratoire, asthme ; Taylor et Williams, 1998 ; Goyer et Clarkson, 2001 ; Abrahams, 2002) et dépendent de leur solubilité dans les fluides du corps humain (Bérubé et al., 1999). Les éléments présents dans ces matériaux sont notamment (1) les éléments essentiels tels que Ca, Co, Cu, Cr, F, I, Fe, Mg, Mo, Mn, Se et Zn pour lesquels les problèmes de santé peuvent résulter ou de déficience ou d'excès, et (2) les éléments non essentiels tels que Al, As, Be, Cd, Pb, Hg, Ni et les radionucléides qui sont toxiques en excès (Nieboer et al., 1999; Plumlee et Ziegler, 2003). L'exposition professionnelle et environnementale à ces éléments concerne les travailleurs et les populations vivant en milieu urbain et industriel. Les premières études ont consisté à déterminer les concentrations et la composition des matières particulaires en suspension sur différents sites urbains et industriels et sur des lieux de travail. Ainsi, dans le secteur industriel, les poussières ont été largement investiguées en vue d'étudier leurs effets sur la santé humaine (e.g. Jarup et al., 1989 ; Antonini et al., 1996; Borak et al., 2000; Herting et al., 2006; Bastian et al., 2009; Goodman et al., 2011). L'exposition humaine aux particules liées au trafic automobile, à la resuspension des poussières de route, à la combustion, etc. a été étudiée plus tardivement (e.g. Chauhan et al., 2004 ; Dagher et al., 2006; Frelon et al., 2007; Wragg et Klinck, 2007; Feng et al., 2009; Barrett et al., 2010; Broadway et al., 2010). Les matières particulaires représentent un réel problème de santé publique notamment en lien avec l'augmentation de la mortalité et morbidité respiratoire et cardiovasculaire (Dockery et Pope, 1994 : Schwartz et al., 1996 : Pope et al., 2002 : Al Saadi et al., 2010).

La forme et la taille des particules inhalées influencent la profondeur à laquelle elles peuvent être transportées dans la trachée respiratoire. La majorité des études *in vitro* est réalisée sur des particules de 2,5 μ m et/ou 10 μ m. Ces tests ont été développés pour simuler les fluides pulmonaires et être ainsi utilisés comme une alternative aux essais *in vivo*. Différentes solutions ont été recensées dans la littérature (Tableau I.4) allant de solutions simples à des fluides pulmonaires simulés (SLF, simulated lung fluids) complexes :

- *Extraction simple à l'eau* (e.g. Paustenbach et al., 1991 ; Roesems, 1997 ; Soukup et al., 2000 ; Heal et al., 2005 ; Mwinyihja et al., 2006 ; Dos Santos et al., 2009) utilisée pour pallier les contraintes analytiques générées par les solutions complexes. Néanmoins, la force ionique du fluide pulmonaire diffère fortement de celle de l'eau ;
- *Extractions séquentielles* (Fernández-Espinoza et al., 2002 ; Gomez et al., 2007 ; Feng et al., 2009) prennent en compte différentes fractions telles que acido-soluble, échangeable, carbonatée, réductrice, oxydante, résiduelle. Elles sont principalement utilisées pour quantifier les fractions métalliques labiles qui pourraient potentiellement être disponibles dans le tractus respiratoire. Néanmoins ces procédures ont été développées spécifiquement pour les sols et sont composées d'étapes utilisant des acides forts qui ne sont pas représentatifs des conditions pulmonaires (notamment du pH) ;
- Solutions complexes simulant la composition des fluides pulmonaires : (1) *PBS* (phosphate-buffered saline ; Zanetti et Fubini, 1997 ; Sadakane et al., 2002 ; Midlander et al., 2006, 2007 ; Arora et al., 2010 ; Copley et al., 2010 ; Son et al., 2010) est une solution physiologique standard qui mime la force ionique du sang ; (2) *solution Gamble* mime le fluide interstitiel au niveau du poumon profond, i.e. le fluide relargué par les cellules alvéolaires de type II (Ansoborlo et al., 1990 ; De Meringo et al., 1994 ; Brock et Stopford, 2003 ; Midlander et al., 2007 ; Colombo et al., 2008) ; (3) *ALF* (artificial lysosomal fluid ; Stopford et al., 2003 ; Herting et al., 2006 ; Midlander et al., 2006, 2007 ; Colombo et al., 2008) simule les conditions intracellulaires dans les cellules pulmonaires qui se produisent lors de la phagocytose par les macrophages (réaction immunologique du corps humain) ; et plus rarement (4) *Eagle's basal medium* (Ansoborlo et al., 1992 ; Lison et Lauwreys, 1992, 1994 ; Saint-Georges et al., 2009), *Hank's buffered salt solution* (Pritchard et al., 1996 ; Vallyathan et al., 2007) et *pyragallol* (Ansoborlo et al., 1990).

La majorité des expérimentations est réalisée à 37°C, excepté pour quelques études où les températures sont de 20°C, 23°C et 100°C (Tableau I.4). Néanmoins, dans ces conditions, il est difficile de déterminer la solubilité absolue des matériaux inhalés et d'en interpréter les résultats. Un autre paramètre pouvant influencer la solubilité des éléments est le pH. Dans les fluides extracellulaires, le pH est d'environ 7,4 tandis qu'il est généralement plus faible, de l'ordre de 4,0 à 5,0 dans le fluide lysosomal. Dans la littérature, le pH recensé dans les différents milieux de dissolution étudiés varie de 2,1 à 7,6 (Tableau I.4).

La quantité de particules inhalées qui atteint la région alvéolaire peut fortement varier en fonction des individus, mais aussi en fonction de la taille et de la concentration des particules. Le volume de fluide pulmonaire peut également fluctuer. De nombreuses études ont été réalisées afin d'estimer ce volume (Macklin, 1955; Weibel, 1973; Rennard et al., 1986; Anderson, 1992). Aussi, en considérant les conditions suivantes: (1) une exposition d'inhalation pendant 24 h, (2) des concentrations de particules variant de 20 μ g/m³ à 500 μ g/m³, (3) 100% des particules inhalées atteignent les alvéoles pulmonaires, (4) une absorption journalière d'air entre 10 et 20 m³, et (5) un volume total de fluide alvéolaire variant de 5 à 20 mL, le ratio solide/liquide (S/L) devrait varier entre 1/100000 et 1/500 (g/mL). Dans la littérature, les ratios S/L varient de 1/20000 à 1/2 (g/mL) (Tableau I.4). Plusieurs études ont montré que le ratio S/L pouvait influencer la dissolution. Midlander et al. (2006) ont mis en évidence que pour des ratios de 1/50, 1/500 et 1/5000 (g/mL), la vitesse de relargage du métal dans le milieu de dissolution diminue avec l'augmentation de la charge en particules, et plus particulièrement pour le ratio 1/50. En 2007, Midlander et al. n'ont pas observé de différences entre 1/10000 et 1/5000. Dans l'étude de Caboche et al. (2011), différent ratios S/L variant de 1/50000 à 1/30 ont été testés et les auteurs ont montré une relative stabilité de la bioaccessibilité des métaux (Ba, Cd, Ce, Co, Cu, La, Mn, Mo, Ni, Pb, Rb, Sb et Zn) entre 1/50000 et 1/500. Pour les ratios au-dessous de 1/500, l'hypothèse d'un risque de saturation de la solution et/ou d'une compétition entre les éléments solubles est avancée.

Le temps d'extraction des particules dans le milieu est un paramètre important à prendre en compte dans les approches *in vitro*. Il doit être représentatif du temps de résidence des matériaux inhalés dans l'environnement pulmonaire. D'après Lehert (1993), les cinétiques d'élimination des particules sont

de l'ordre de 24 h au niveau du segment trachéo-bronchique et entre une semaine et des centaines de jours dans la région alvéolaire. Environ 10 à 15% des particules initiales déposées dans l'arbre bronchial seraient toujours présents après 24 h (Hofmann et Asgharian, 2003). Les temps d'extraction recensés dans la littérature sont fortement variables et vont de temps très courts (quelques minutes à plusieurs heures) à des temps de résidence beaucoup plus longs (24 h à plusieurs jours). Le choix de ce paramètre dépend notamment du ratio S/L et des caractéristiques des particules (e.g. taille, concentration et spéciation des éléments).

Material (source)	Elements	Particle size	Dissolution media (pH)	Mass	Extractant volume (mL)	Residence time	T°C	References
Dust (Industry)	UF4	<10µm	Sodium bicarbonate Gamble (7.0) Pyrogallol/SOD	10-16 mg	10	28 days	37	Ansorborlo et al. (1990)
Dust (Industry)	UO3.xH20	<10µm	Water Eagle's basal medium Gamble (7.0) Sodium bicarbonate Sodium phosphate Sodium citrate	10-16 mg	10	28 days	37	Ansorborlo et al. (1992)
Dust (Industry) Dust (Industry)	Y, La, Ce, Nd, Sm Cr	<1µm <10µm	Gamble (7.6) Water Sodium bicarbonate	0.5 g filter	- 40	1 day - 1 week 8h - 24h	- 23	Takaya et al. (2006) Paustenbach et al. (1991)
Dust (Metal industry) Dust (Tannery)	Co Cr, Pb, Fe, Cu, Cd, Ni, Zn	<5µm -	PBS (7.4) Water	45 mg 1 g	2 10	1 - 5 min 30 min	37 -	Zanetti and Fubini (1997) Mwinyihja et al. (2006)
Dust (Industry)	Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cı	1 2.61-5.07µm	Saline + HBSS	0.3 mL cell suspension	0.3	96h	,	Pritchard et al. (1996)
Dust (Metal industry)	Cr, Fe, Ni, V	<50µm	Saline	20 mg	1	30-60 min	37	Schluter et al. (2005)
Dust (Industry)	Zn, Ni, Fe, V, Cu, Pb	<10µm	Water	filter	, t		37	Soukup et al. (2000)
Stamless steel particles (Industry)	Fe, N1, Cr	ı	ALF (4.5)	/ cm ²		8 - 168h	31	Herting et al. (2006)
Stainless steel particles (Industry)	Cr, Ni, Fe, Mo		Gamble (7.4) + ALF (4.5)	7 cm ²	7 + 5	8 - 24h + 168h	37	Herting et al. (2007)
Stainless steel particles (Industry)	Fe, Cr, Ni	5.5µm to 44 µm	PBS (7.2-7.4) ALF (4.5)	2-20-200 mg	10	2 weeks	37	Midlander et al. (2006)
Manmade fibers (Industry)	Co	0.70 µm to 4092 µm	Gamble (7.4) Alveolar (7.4) ALF (4.5-5.0) Serum (7.2-7.4)	<u>م</u>	50	2 - 5 - 24 - 72h	37	Stopford et al. (2003)
Cobalt materials (Hard metal industry)	Co	<5µm	MEM	5 mg	1	18h	37	Lison and Lauwreys (1992, 1994)
Industrial aerosol	Ņ	<100µm	Ammonium citrate (4.4) Citric acid (2.1) Water (6.3) Interstrital (7.4)	0.1 g	50	1 - 24h	37	Oller et al. (2009)
Chromate slag (Industry) Dust (Metal processing industry)	Cr Co, W, C	<30µm <5µm	Nitric acid 50% Water		- 10	2h 18h	100 37	Vasilki Krisa et al. (1992) Roesems (1997)
Dust (Industry)	SiO ₂	5-10µm	Gamble (6.0-6.5-7.5)	100-200 mg	400	7 days to 28 days		Larson et al. (2010)

Tableau I.4. Conditions expérimentales utilisées dans le cadre des études sur la solubilité de matériaux inhalés³

³ ALF : artificial lysosomal fluid ; DPL : Dipalmitoyl lecithin ; DPPC : dipalmitoylphosphatidylcholine ; HBSS : Hank's buffered salt solution ; MEM : modified Eagle's medium ; PBS : phosphate-buffered saline ; SLF : simulated lung fluid ; SOD : superoxide dismutase

I	I										Та	ıble	eau	II.	4. S	ui	ite									
References	Vallyathan et al. (2007)	Broadway et al. (2010)	Drysdale et al. (2012)		Mullins et al. (1994)	Wragg and Klinck (2007)	Colombo et al. (2008)		Dos Santos et al. (2009)		Fernandez-Espinoza et al. (2002)		Feng et al. (2009)		Gutierrez-Castillo et al. (2005)		Heal et al. (2005)	Karthikeyan et al. (2006)	Midlander et al. (2007)		Caboche et al. (2011)		Voutsa and Samara (2002)	Niu et al. (2010)		Saint-Georges et al. (2009)
T°C		37	37		37.5	37	37		20		20		20		20		20		1 37		- 37		37	37		37
Residence time	-	2h to 624h	1h - 1 day - 7 days		2h	2h to 630h	up to 30 days		lh		3h		3h		15 min	;	Ih	5 min	0.5 - 1 - 4 - 8 - 24h + 48h	for Gamble	15 min - 30 min - 1h - 2h	4h - 5h - 24h - 48h - 72h	60 min	2h		24h
Extractant volume (mL)	1	20	10		120	20	100		10		15		15		10	I	L	15	50		20		15	10		5
Mass	100 µL cell suspension	0.5 g	0.25 g		filter	0.45-0.55 g	0.1 g - 1 g (certified	samples)	filter		filter		filter		filter	***	filter	filter - 10 mg (certified samples)	5-10 mg		between 1 mg and 2 mg		filter	filter		50% calculated lethal dose
Dissolution media (pH)	HBSS	Samble (7.3)	Gamble (7.1-7.4)		Physiological saline + DPL	Gamble (7.3)	ALF (4.5)	Camble (7.4)	Water (7.0)		Water (7.4)		Water (7.4)		Water		Water (5.1-5.4)	Water	PBS (7.2-7.4)	ALF (4.5) Gamble (7.4)	Water	Gamble (7.4)	Serum (7.4)	Ammonium acetate 0.01M (7.0)		VIEM
Particle size	<10µm	<10µm	<10µm		<1.1µm	<10µm	<90µm		<2.5µm and <10µm		>10µm to <0.61µm		<2.5µm		<10µm		≪2.5µm and <10µm	≪2.5µm and <10µm	-				<7.2 µm	1000-10000nm	100-1000nm 57-100nm	0.33-5.0µm
Elements	quartz, cristobalie, triymite, Na, Mg, Al, Si, Ca, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Cd, Pb	Cr	Ni		Pb, As, Cu, Mn, Cd	Pb	Pt, Pd, Rh, certifed samples		Al, Ba, Ca, Cr, Fe, Mg, Mn,	Pb, Se, Ti, Zn	Mg, Ca, Ti, V, Mn, Fe, Co,	Ni, Cu, Ca, FD	Al, Fe, Zn, Pb, Mn, Cu, As,	Cr, Ni, Cd, Mo, Co	Zn, Fe, Ti, Pb, Mn, V, Ni, Cr,		As, Cd, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni, Pb, Ti, V, Zn	As, Co, Cu, Cd, Cr, Mn, Ni, V, Zn, Fe, Pb	Cu		Ba, Cd, Ce, Co, Cu, La, Mn,	Mo, Ni, Pb, Rb, Sb, Zn	Cd, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn	V, Mn, Ni, Cu, Zn, Se, Cd		Fe, Al, Ca, Na, K, Mg, Pb, Ti, VOCs, PAHs
Material (source)	Dust and airborne silica (Farming)	Urban soil	Soil (nickel smelter and	metal mining activities)	Soil (windblown dust)	Urban soil	Particulates (vehicular	traffic)	Particulates (vehicular	traffic)	Urban particles (traffic,	industriai areas, sues whut cleaner air)	Urban particles		Urban particles	•	Urban background aerosol (roof of University)	Urban airborne particles	Powder particles (vehicular	traffic)	Atmospheric particles	(certified samples)	Urban particles (Industrial sites)	Urban ambient air particles		Atmospheric particles (traffic, air particulates)

If change particles and 0.4m PBS Solge - 1 mg volume (mL) If change particles and 0.4m PBS 30 , ge - 1 mg $ -$		Elements	Particle size	Dissolution media (pH)	Mass	Extractant	Residence time	T°C Re	ferences	1
use particles and 0.4μ PBS $50\mu\text{c} - 1\mu\text{c}$ $2\mu\text{ vecks}$ S dathane et al. (2002) goldes $40-125\mu\text{m}$ Gamble (7.4) 2 4 $40-125\mu\text{m}$ Gamble (7.0) 2 $40-125\mu\text{m}$ Gamble (7.4) $1\mu\text{g}$ 2 4 $40-125\mu\text{m}$ 5 $40-125\mu\text{m}$ 5 $40-125\mu\text{m}$ 5 $40-125\mu\text{m}$ 5 5 $40-125\mu\text{m}$ 5 <th></th> <th></th> <th></th> <th>, g</th> <th></th> <th>volume (mL)</th> <th></th> <th></th> <th></th> <th></th>				, g		volume (mL)				
	Diesel exh dermatoph	aust particles and agoides	0.4µm	PBS	50 µg - 1 mg		2 weeks	- Sa	lakane et al. (2002)	1
	U, Th		40-125 µm	Camble (7.0)		ı	4h to 30 days	37 Fre	clon et al. (2007)	
T. Ni, Cu, Co · Prosphate solution 10mM (4.5) 2.7 g 30 $3h \cdot 1$ day -3 days -7 days 20 Zhang (2002) T. Cu, Fe, Mn, Ni, · Water (7.4) 100 mg 15 $3h$ -1 days -3 days -7 days 20 Zhang (2002) Pb, Cr, Zn · Water (7.4) 100 mg 12 2 and 100 $1h$ $-$ Wang et al. (2001) Db, Cr, Zn · Water (7.4) 1 2 2 and 100 $1h$ $ -$ Wang et al. (2001) D, Cr, Zn · · Water (7.0) $1g$ $20 \cdot 50$ g days 37 $ -$ <td>Hg</td> <td></td> <td>0.150µm</td> <td>Gamble (7.4) Water (5.0)</td> <td>1 g</td> <td>20</td> <td>24h</td> <td>37 Gr</td> <td>ay et al. (2010)</td> <td></td>	Hg		0.150µm	Gamble (7.4) Water (5.0)	1 g	20	24h	37 Gr	ay et al. (2010)	
Ch. Cu, Fe, Mn, Ni, - Water (7.4) 100 mg 15 3h 20 Gomez et al. (2007) $7, Zn$ Water (7.4) 100 mg 15 3h 20 Gomez et al. (2007) Pb, Cr, Zn · Water (7.4) 1g 20 6 days 37 Twining et al. (2001) Du, Ni, Pb, Sr, Th, U, <loµm< th=""> SIF 1g 20 6 days 37 Twining et al. (2001) Du, Ni, Pb, Sr, Th, U, <loµm< th=""> SIF 1g 20 6 days 37 Twining et al. (2001) Du, Ni, Pb, Sr, Th, U, <loµm< th=""> SIF 1g 50-50 µg 144 up to Sh 37 Twining et al. (2010) Du add abuerol filters ($Z_1-3.3\mu$m BSS (7.4) 50-250 µg 144 up to Sh 37 Twining et al. (2010) Diada abuerol filters ($Z_1-3.3\mu$m BSS (7.4) 50-250 µg 144 up to Sh 37 Copley et al. (2010) Diada abuerol filters ($Z_1-3.3\mu$m BSS (7.4) 300 5-15-30-60-90-120 37 Son et al. (2010) Tr Phosphate buffer 0.2M (7.4) Phosphate buffer 0.2M (7.4) Phosphate buffer 0.2M (7.4) Pho</loµm<></loµm<></loµm<>	Fe, Ca,	Cr, Ni, Cu, Co	ı	Phosphate solution 10mM (4.5)	2.7 g	30	3h - 1 day - 3 days - 7 days 2	20 Zh	ang (2002)	
$ \begin{array}{cccccc} Ph, Cr, Zh & - & Water & 1 g & 2 \mbox{ and } 10 & 1h & - & Wang \mbox{ et al.} (2001) \\ Cu, Ni, Ph, Sr, Th, U, < loµm & SLF & 1 g & 20 & 6 \mbox{ days} & 37 & Twining \mbox{ et al.} (2005) \\ steroids & filters (2.1-3.3µm & PBS (7.4) & 50-250 \mbox{ µp } 05 & 1.4 & up \mbox{ lo } 5h & 37 & Aroa \mbox{ et al.} (2010) \\ mide \mbox{ and } 4.7-5.8\mum & SLF & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ mide \mbox{ and } 4.7-5.8\mum & SLF & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & $	Al, As, Pb, Ti,	Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, V, Zn	ı	Water (7.4)	100 mg	15	3h	20 Go	mez et al. (2007)	10
Cu, Ni, Pb, Sr, Th, U, <10µmSLFI g206 days37Twining et al. (2005)steroidsfilters (2.1-3.3µmPBS (7.4)50-250 µg1.4up to 5ħ37Arora et al. (2010)steroidsfilters (2.1-3.3µmWater (7.0)S1F-3001-2ħ37Copley et al. (2010)inde and albuterolfiltersS1F-3001-2ħ37Copley et al. (2010)inde and albuterolfiltersS1F-3001-2ħ37Copley et al. (2010)inde and albuterolfilters (-5µm)B1S-3005-15-30-60-90-12037Son et al. (2010)indPhosphate buffer 0.2M (7.4)-3005-15-30-60-90-12037Son et al. (2010)inPhosphate buffer 0.2M (7.4)3005-15-30-60-90-12037Son et al. (2010)inPhosphate buffer 0.2M (7.4)Phosphate buffer 0.2M (7.4)2-4-8-12-24h37Son and McConville (2000)inPhosphate buffer 0.2M (7.4)- <td< td=""><td>Cd, Cu,</td><td>Pb, Cr, Zn</td><td></td><td>Water</td><td>1 g</td><td>2 and 100</td><td>-</td><td>- Wi</td><td>ung et al. (2001)</td><td></td></td<>	Cd, Cu,	Pb, Cr, Zn		Water	1 g	2 and 100	-	- Wi	ung et al. (2001)	
	Al, Cr, V, Zn	Cu, Ni, Pb, Sr, Th, U,	<10µm	SLF	1 g	20	6 days	37 Tw	ining et al. (2005)	
onide and albuterolfiltersSLF- 300 $1 - 2h$ 37 Copley et al. (2010)tePhosphate buffer $0.2M$ (7.4)Phosphate buffer $0.2M$ (7.4)- 300 $5 - 15 - 30 - 60 - 90 - 120$ 37 Son et al. (2010)lerPhosphate buffer $0.2M$ (7.4)Phosphate buffer $0.2M$ (7.4)- 300 $5 - 15 - 30 - 60 - 90 - 120$ 37 Son et al. (2010)lerPhosphate buffer $0.2M$ (7.4)Phosphate buffer $0.2M$ (7.4)- 300 $5 - 15 - 30 - 60 - 90 - 120$ 37 Son et al. (2010)lerPhosphate buffer $0.2M$ (7.4)Phosphate buffer $0.2M$ (7.4)- 300 $5 - 15 - 30 - 60 - 90 - 120$ 37 Son et al. (2010)lerPhosphate buffer $0.2M$ (7.4)Phosphate buffer $0.2M$ (7.4)- 300 $5 - 15 - 30 - 60 - 90 - 120$ 37 Son et al. (2010)lerPhosphate buffer $0.2M$ (7.4)Phosphate 0.02% - $1 - 2 - 4 - 8 - 12 - 24h$ 37 Son and McConvile (2009)ized hydrocortisonepowder + filtersSLF 100 mg 20 $1 - 2 - 4 - 8 - 12 - 24h$ 37 Son and Feddah (2003)orticoidsfilterSLF $-2 - 4 - 8 - 12 - 24h$ 37 Davies and Feddah (2003)	Cortice	osteroids	filters (2.1-3.3µm and 4.7-5.8µm)	PBS (7.4) Water (7.0)	50-250 µg	1.4	up to 5h	37 Ar	ora et al. (2010)	
In HFA and Pulmicort filters (<5µm) SLF - 300 5 - 15 - 30 - 60 - 90 - 120 37 Son et al. (2010) ler Phosphate buffer 0.2M (7.4) Pins nim nim nim ler PBS modified PBS with DPPC 0.02% nim nodified PBS with DPPC 0.02% nodified PBS with DPPC 0.02% no mg 20 1 - 2 - 4 - 8 - 12 - 24h 37 Son and McConvile (2009) nodified SLF with DPPC 0.02% no diffied SLF with DPPC 0.02% no diffied SLF with DPPC 0.02% 20 1 - 2 - 4 - 8 - 12 - 18 - 37 Davies and Feddah (2003) 20 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 12 - 18 - 37 Davies and Feddah (2003) 20 24 - 30h 24	Budes	onide and albuterol te	filters	SLF Phosphate buffer 0.2M (7.4) PBS		300	1 - 2h	37 Co	pley et al. (2010)	
ized hydrocortisone powder + filters SLF 100 mg 20 1 - 2 - 4 - 8 - 12 - 24h 37 Son and McConville (2009) modified SLF modified SLF with DPPC 0.02% - 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 12 - 18 - 37 Davies and Feddah (2003) orticoids filter SLF - 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 12 - 18 - 37 Davies and Feddah (2003)	Ventol Flexha	in HFA and Pulmicort ler	: filters (⊲5µm)	SLF Phosphate buffer 0.2M (7.4) PBS modified PBS with DPPC 0.02%		300	5 - 15 - 30 - 60 - 90 - 120 - 3 min	37 So	n et al. (2010)	
orticoids filter SLF - 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 12 - 18 - 37 Davies and Feddah (2003) 24 - 30h 24 - 30h	micorn	ized hydrocortisone	powder + filters	SLF modified SLF with DPPC 0.02%	100 mg	20	1 - 2 - 4 - 8 - 12 - 24h	37 So	and McConville (2009)	
	glucoc	orticoids	filter	SLF			1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 -12 - 18 · 3 24 - 30h	37 Da	vies and Feddah (2003)	· 1

52

Les expérimentations *in vitro* de dissolution des matériaux inhalés peuvent être réalisées en mode statique ou dynamique :

- Mode statique : les particules collectées et le milieu de dissolution sont mélangés et placés en agitation dans un incubateur ou un bain pendant un temps d'extraction et à une température définis. A l'issue du test, différentes méthodes sont utilisées pour séparer la fraction bioaccessible de la non-bioaccessible, à savoir la centrifugation (de 2500 rpm à 15000 rpm) et/ou la filtration (de 0,2 μm à 0,8 μm);
- *Mode dynamique* : les tests dynamiques sont de plus en plus utilisés, notamment dans le secteur pharmaceutique, car plus proches des conditions *in vivo* (Davies et Feddah, 2003 ; Arora et al., 2010 ; Riley et al., 2012). Leur réalisation consiste à déposer des particules (souvent médicaments) à la surface d'une membrane ou d'un filtre et à placer le tout directement dans un bain contenant le milieu de dissolution avec un débit spécifique (allant de 0,5 à 1,5 mL/min).

I.3. Bioaccessibilité orale et bioaccessibilité pulmonaire : choix des tests in vitro

I.3.1. Bioaccessibilité orale : le test UBM

Au regard de la diversité des méthodes publiées et en raison des divergences des résultats, le groupe BARGE⁴, fédération d'instituts et de laboratoires pluridisciplinaires, a développé un test de digestion *in vitro* unifié (UBM⁵) dont l'objectif était de proposer un protocole unique, simple, représentatif de la réalité physiologique de l'enfant et validé au regard d'un modèle *in vivo*. Membre actif du groupe BARGE depuis 2008, mes travaux de recherche ont porté sur l'utilisation et l'amélioration de ce test.

Développé en 2005 en vue de déterminer la bioaccessibilité orale des polluants métalliques en lien avec l'ingestion de particules de terre (Cave et al., 2006 ; Wragg et al., 2011), le test *in vitro* UBM est basé sur la méthode RIVM (Oomen, 2000 ; Oomen et al., 2002 ; Oomen et al., 2003a) considérée comme la plus représentative des conditions physiologiques du tractus gastro-intestinal de l'enfant. Quelques modifications ont été apportées au protocole dans l'objectif d'avoir un test robuste, applicable à des sols aux caractéristiques variées (en termes d'historique de contamination et de propriétés physico-chimiques) et d'être le plus conservatoire possible (i.e. ne pas sous-estimer les niveaux de risques liés à l'ingestion de terre contaminée). Il a de plus été validé par rapport à un modèle *in vivo* (le porcelet) pour Cd, Pb et As (Caboche, 2009 ; Denys et al., 2012).

I.3.1.1. Description du protocole

Le test UBM a été conçu pour une ingestion non intentionnelle de particules de sol et peut être étendu, dans une approche d'évaluation de l'exposition, à d'autres matrices telles que les sédiments, les végétaux, les poussières, les cendres, etc (Wragg et al., 2011).

La mesure de la bioaccessibilité orale (Figure I.5) est réalisée à partir d'une masse de 0,6 g de sol (séché, tamisé et homogénéisé). Sont considérées les particules de sol inférieures à 250 µm car représentatives des particules adhérant majoritairement aux mains des enfants (Rodriguez et al., 1999 ; Paustenbach, 2000). A cette masse est ajouté un volume de 9 mL de fluide salivaire. La suspension est homogénéisée manuellement puis 13,5 mL de fluide gastrique sont alors ajoutés à la suspension.

⁴ Bioaccessibility Research Group of Europe

⁵ Unified Bioaccessibility Method



Figure I.5. Représentation schématique du protocole de digestion in vitro UBM [52]

Après homogénéisation, le pH de la suspension est ajusté à 1,2-1,7 par l'ajout d'HCl (37%) ou de NaOH (1 M). Après agitation pendant 1 h à 37°C, la phase gastrique est collectée par centrifugation de la suspension à 3000 g pendant 5 minutes. Le surnageant est prélevé et acidifié (500 μ L d'HNO₃ 70%) et la concentration en métal mesurée représente la fraction bioaccessible dans la phase gastrique (phase G). La fraction intestinale est mesurée en ajoutant un fluide simulant le fluide digestif intestinal, c'est-à-dire 27 mL de solution duodénale et 9 mL de solution biliaire. Le pH de la suspension est ajusté à $6,3 \pm 0,5$. La suspension est ensuite homogénéisée pendant 4 h à 37°C et centrifugée à 3000 g pendant 5 minutes. Le surnageant obtenu est acidifié (1 mL d'HNO₃ 70%) et analysé en vue de déterminer la concentration en métal dans cette phase (dite gastro-intestinale ; phase GI). Les fluides utilisés dans le cadre de ce protocole sont composés de réactifs organiques et inorganiques de composition proche de celle du fluide digestif humain (Tableau I.5) et sont préparés un jour avant la réalisation des extractions pour permettre la bonne dissolution des composés.

Solution salivaire	Solution gastrique	Solution duodénale	Solution biliaire
	Solution inorganic	que (500 mL)	
896 mg KCl 888 mg NaH ₂ PO ₄ 200 mg KSCN 570 mg Na ₂ SO ₄ 298 mg NaCl 1,8 mL NaOH 1,0 M	2752 mg NaCl 266 mg NaH ₂ PO ₄ 824 mg KCl 400 mg CaCl ₂ 306 mg NH ₄ Cl 8,3 mL HCl 37%	7012 mg NaCl 5607 mg NaHCO ₃ 80 mg KH ₂ PO ₄ 564 mg KCl 50 mg MgCl ₂ 180 μL HCl 37%	5259 mg NaCl 5785 mg NaHCO ₃ 376 mg KCl 180 μL HCl 37%
	Solution organiqu	ue (500 mL)	
200 mg urée	650 mg glucose 20 mg acide glucuronique 85 mg urée 330 mg chlorhydrate de glucosamine	100 mg urée	250 mg urée
	Constituants ad	ditionnels	
145 mg α-amylase 50 mg mucine 15 mg acide urique	1 g sérum albumine bovin 3 g mucine 1 g pepsine	200 mg CaCl ₂ 1 g sérum albumine bovin 3 g pancréatine 500 mg lipase	222 mg CaCl ₂ 1,8 g sérum albumine bovin 6 g bile

Tableau I.5. Composition des solutions digestives utilisées lors des phases du test in vitro

Ils sont conservés à température ambiante toute la nuit avant la réalisation des extractions. Les solutions sont ensuite chauffées à 37°C au moins 2 h avant la mise en œuvre du protocole de digestion.

Dans le cadre de mes expérimentations, la bioaccessibilité orale des métaux dans les digestats est déterminée dans les deux phases (gastrique et gastro-intestinale) par spectrométrie d'absorption atomique en mode flamme (SAA, AA-6800, Shimadzu). Lorsque le test est appliqué sur une matrice végétale, les analyses sont réalisées par spectrométrie de masse couplée à un plasma d'argon (ICP-MS, Série X2, Thermo Scientific). De plus, pour assurer la qualité de la mesure, sur chaque série d'échantillons, j'ai ajouté un blanc et un échantillon de référence (NIST SMR 2710 et 2710a ou échantillon interne). Pour chaque échantillon, des triplicats sont réalisés, et ceci dans les deux phases d'extraction.

I.3.1.2. Essais de répétabilité et reproductibilité

Pour les tests in vitro, il convient de vérifier leur répétabilité et leur reproductibilité, au moyen d'essais intra- et inter-laboratoires. Le test UBM a fait l'objet d'une étude récente (Wragg et al., 2011) où sept laboratoires ont mis en œuvre ce test afin d'estimer la bioaccessibilité de l'arsenic (sur 11 échantillons), du cadmium (sur 9 échantillons) et du plomb (sur 13 échantillons). Des coefficients de variation (CV) intra- (répétabilité) et inter- (reproductibilité) laboratoires ont été calculés. Selon le polluant et le compartiment du test considéré, les CV varient en moyenne de 3,8 à 14,6% pour la répétabilité et de 7,4 à 81,4% pour la reproductibilité. Sont considérés comme acceptables, au regard des critères de validation des tests, des CV inférieures à 10% dans le cadre de l'étude de la répétabilité intra-laboratoire et inférieures à 20% pour la reproductibilité inter-laboratoires. Les essais sur le test UBM menés dans l'étude de Wragg et al. (2011) respectent les critères fixés avec un CV pour la répétabilité en général inférieur à 10%. Par contre, ces essais mettent en évidence des résultats avec une faible reproductibilité du test. Plusieurs constats ont été faits : (1) une répétabilité et reproductibilité variables en fonction du degré de contamination du sol (CV plus élevés lorsque les concentrations sont plus faibles et proches des limites de quantification du matériel analytique); (2) une répétabilité et reproductibilité pour les éléments cationiques (tels que Cd, Pb et Zn) plus faibles dans la phase intestinale par rapport à la phase gastrique ; (3) une faible reproductibilité en lien avec des gammes de pH dans les deux phases assez larges (entre 1,2 et 1,7 dans la phase gastrique et entre 5,8 et 6,8 dans la phase gastro-intestinale). Suite à cette étude, les membres du groupe BARGE ont préconisé d'autres travaux afin d'affiner au mieux le protocole du test UBM en vue d'améliorer sa répétabilité et reproductibilité.

Dans cet objectif, j'ai mené des expérimentations en 2009 **[20]**. La démarche a consisté à choisir trois échantillons issus de sols agricoles (nommés A, B et C) et quatre issus de sols urbains (D, E, F et G) présentant des caractéristiques physico-chimiques et des degrés de contamination variés (Tableau I.6). Suite aux constats faits dans l'étude de Wragg et al. (2011), une modification a été apportée au protocole au niveau du pH dans la phase G. Le pH dans cette phase devant être compris entre 1,2 et 1,7, il a été fait le choix pour ces expérimentations de l'ajuster à $1,50 \pm 0,05$.

		argile	limons	sables	pН	CaCO ₃ total	Matières organiques	Cd total	Pb total	Zn total
			g/kg				g/kg		mg/kg	
C 1	А	259	664	77	8,2	68	55,2	9,6	507	613
Sols	В	139	418	443	8,3	8	35,9	3,4	163	235
agricoles	С	181	660	159	7,8	9	25,6	8,8	451	587
	D	152	460	388	7,3	13	132,7	21,2	2867	6908
Sols	Е	249	567	184	6,7	1	110,9	26,8	2043	1796
urbains	F	184	573	243	6,8	1	49,1	31,4	824	4832
	G	199	452	349	6,8	1	27,2	4,0	239	326

Tableau I.6. Caractéristiques physico-chimiques des sols sélectionnés

La répétabilité a été évaluée par le même opérateur sur les échantillons A, B, C, D, E et F (Tableau I.7) **[22]**. Plus spécifiquement, des mesures en triplicats ont été réalisées dans les deux phases G et GI au sein d'une même expérimentation puis, l'expérimentation a été refaite à plusieurs jours d'intervalle dans les mêmes conditions.

		1 ^{èr}	^e expérimentat	tion	ion 2 ^{ème} expérimen							
		Cd	Pb	Zn	Cd	Pb	Zn					
е	Α	$4,9 \pm 0,1 (2,3)^{a}$	$237 \pm 6(2,7)$	$189 \pm 6(3,5)$	$5,2\pm 0,2(2,9)$	$223 \pm 1(0,2)$	$206 \pm 4(1,8)$					
riqu	В	$4{,}9\pm0{,}1(0{,}7)$	$85 \pm 1(1,2)$	$457 \pm 3(0,6)$	$5,2 \pm 0,1 \ (1,8)$	$83 \pm 1(0,8)$	$502 \pm 6(1,2)$					
astı	С	$3,9 \pm 0,1(1,4)$	$199 \pm 1(0,6)$	$125 \pm 1(0,9)$	$4,\!0\pm 0,\!1(0,\!6)$	$175 \pm 4(2,4)$	$131 \pm 1(0,6)$					
e s	D	$13,9 \pm 0,3 \ (2,4)$	$1758 \pm 44(2,5)$	$3657 \pm 102(2,8)$	$12{,}7\pm0{,}5(4{,}2)$	$1972 \pm 82(4,2)$	$3673 \pm 153(4,2)$					
has	Е	$18,8 \pm 0,3 \ (1,5)$	$1339 \pm 9(0,7)$	$728 \pm 13(1,8)$	$17,\!6\pm0,\!3(1,\!9)$	$1460 \pm 37(2,6)$	$718 \pm 27 (3,7)$					
Ρ	F	$24,\!2\pm0,\!1(0,\!4)$	$516 \pm 4(0,9)$	$2870 \pm 42(1,5)$	$21{,}7\pm0{,}2{}(1{,}0)$	$588 \pm 16(2,8)$	$3007 \pm 96(3,2)$					
	Α	$2,\!8\pm0,\!1(2,\!3)$	$91 \pm 7(7,1)$	$58 \pm 2(3,6)$	$2,\!8\pm0,\!1(2,\!1)$	$78 \pm 5(6,7)$	$64 \pm 7(10,1)$					
tro. le	В	$3,4\pm 0,2(4,0)$	$15 \pm 5(29,4)$	$164 \pm 8 (4,7)$	$3,6 \pm 0,1 \ (1,8)$	$16 \pm 3(17,5)$	$181 \pm 7 (3,7)$					
gas ina	С	$2{,}9\pm0{,}1(2{,}7)$	$65 \pm 6(9,3)$	$46 \pm 2(7,0)$	$2,\!8\pm0,\!3(10,\!6)$	$62 \pm 6(9,1)$	$49 \pm 1(0,9)$					
se a	D	$8,\!3\pm0,\!2(2,\!2)$	$1161 \pm 29(2,5)$	$2242 \pm 55(2,5)$	$7,\!0\pm 0,\!2(2,\!4)$	$1310 \pm 10(0,8)$	$1878 \pm 44(2,3)$					
Pha in	Е	$8,5 \pm 0,2(2,4)$	$883 \pm 9(1,0)$	$404 \pm 5(1,3)$	$7,\!4\pm0,\!0(0,\!5)$	$970\pm19(1,9)$	$345 \pm 7(2,2)$					
	F	$16,1\pm0,3(1,9)$	$359 \pm 2(0,5)$	$1282 \pm 14(1,1)$	$16{,}3\pm0{,}4(2{,}4)$	$380 \pm 6(1,6)$	$1295 \pm 27(2,1)$					

Tableau I.7. Bioaccessibilité de Cd, Pb et Zn dans les phases gastrique (G) et gastro-intestinale (GI) mesurée par un même opérateur dans les sols agricoles (A, B, C) et dans les sols urbains (D, E, F) sélectionnés **[20]**

^a moyenne \pm écart type exprimées en mg/kg (*CV exprimé en %*)

Concernant la répétabilité de la mesure au sein d'une même expérimentation, les écarts types et les CV calculés sont relativement faibles (CV < 10%), notamment dans la phase G. Des CV plus importants de 29,4 et 17,5% (expérimentations 1 et 2 respectivement) sont observés pour la mesure de la bioaccessibilité GI de Pb dans l'échantillon B qui présente la plus faible concentration en métal. Ce résultat rejoint l'observation faite dans le cadre de l'étude de Wragg et al. (2011) qui indiquait une plus faible répétabilité en lien avec des concentrations faibles dans le sol. Pour la répétabilité de la mesure entre les deux expérimentations, la comparaison des moyennes a été réalisée et met en évidence de bons taux de recouvrement variant de 89,2 à 119,4%.

Pour la reproductibilité, la variabilité de la mesure de bioaccessibilité a été évaluée en comparant les résultats obtenus sur les échantillons D, E, F et G par trois opérateurs différents (Tableau I.8) **[20]**.

		1	^{er} opé rate ı	ır	2	^{eme} opé rate	ur	3 ^è	^{me} opé rate	ur		
		Cd	Pb	Zn	Cd	Pb	Zn	Cd	Pb	Zn		
D	Phase G	$13{,}9\pm0{,}3^{a}$	1758 ± 44	4657 ± 102	$13{,}4\pm0{,}2$	1879 ± 10	4433 ± 73	$13{,}7\pm0{,}3$	1309 ± 13	4376 ± 105		
	Phase GI	$8,3\pm0,2$	1161 ± 29	2223 ± 55	$8{,}0\pm0{,}2$	1102 ± 21	2756 ± 10	$8{,}9\pm0{,}1$	1087 ± 42	2252 ± 74		
Е	Phase G	$18,8\pm0,3$	1339 ± 9	728 ± 13	$20{,}2\pm0{,}6$	1450 ± 11	857 ± 17	$19,1\pm0,1$	1150 ± 9	877 ± 3		
	Phase GI	$8{,}5\pm0{,}2$	883 ± 9	404 ± 5	$8,1\pm0,\!0$	947 ± 11	483 ± 15	$10{,}5\pm0{,}2$	888 ± 4	385 ± 1		
F	Phase G	$24,2\pm0,1$	516 ± 4	3870 ± 42	$24{,}7\pm0{,}5$	536 ± 9	4086 ± 62	$24{,}6\pm0{,}1$	578 ± 3	3521 ± 132		
	Phase GI	$16,1\pm0,3$	359 ± 2	1882 ± 14	$16{,}0\pm0{,}1$	321 ± 11	2253 ± 64	$17,5\pm0,3$	395 ± 5	1873 ± 76		
G	Phase G	$2{,}6\pm0{,}0$	138 ± 2	83 ± 2	$2{,}3\pm0{,}1$	156 ± 4	54 ± 3	$2,\!6\pm0,\!0$	163 ± 2	101 ± 2		
	Phase GI	$1,6\pm0,0$	97 ± 5	30 ± 2	$0,8\pm0,1$	84 ± 3	37 ± 1	$1,7\pm0,0$	85 ± 1	39 ± 1		

Tableau I.8. Bioaccessibilité de Cd, Pb et Zn dans les phases gastrique (G) et gastro-intestinale (GI) mesurée par3 opérateurs dans les sols urbains (D, E, F et G) sélectionnés [20]

^a moyenne \pm écart type exprimées en mg/kg

Pour l'ensemble des expérimentations, chaque échantillon est réalisé en triplicat dans les deux phases G et GI. Une analyse statistique (ANOVA, test de Tukey, $\alpha = 5\%$) a été effectuée pour comparer les valeurs de bioaccessibilité obtenues par les trois opérateurs pour un même échantillon. Aucune différence significative n'a été observée montrant ainsi la bonne reproductibilité du test dans les conditions choisies.

I.3.1.3. Paramètres sensibles du test UBM

Plusieurs facteurs peuvent influer sur la bioaccessibilité orale des métaux, à savoir les propriétés physico-chimiques des matrices et des polluants, les propriétés physiologiques du corps humain ainsi que les conditions de réalisation du test. Dans cette partie, je me suis intéressée à la conduite du test et aux propriétés physiologiques du corps humain, *via* différents paramètres du test, en vue d'améliorer le protocole utilisé. L'influence des paramètres physico-chimiques, en particulier des sols, sur la bioaccessibilité orale des métaux est traitée dans le chapitre suivant.

a) Conservation des solutions digestives

Les solutions digestives (i.e. salivaire, gastrique, duodénale et biliaire) sont préparées la veille de l'expérimentation et sont conservées à température ambiante toute la nuit. Les solutions sont ensuite chauffées à 37°C au moins 2 h avant la mise en œuvre du test UBM. Les solutions sont des mélanges de réactifs organiques/inorganiques et d'enzymes. L'activité des enzymes et les caractéristiques physico-chimiques des molécules, dont la solubilité, sont dépendantes de la température (Oomen et al., 2003b). Ainsi, j'ai étudié l'impact de la température de conservation des solutions digestives sur la bioaccessibilité de Cd et Pb [**48**]. A l'issue de la préparation des 4 solutions, chacune d'elles a été séparée en 3 afin d'être conservée toute la nuit aux températures suivantes : $(1) < 4^{\circ}C$; (2) température ambiante (20°C) et (3) 37°C. Le jour de l'expérimentation, toutes les solutions ont été placées à 37°C pendant 2 h. Le test UBM a ensuite été réalisé pour chaque lot de solutions sur 2 échantillons de sol (Figure I.6).





Les résultats montrent que la température de conservation des solutions digestive est un paramètre sensible du test UBM. En effet, des différences de bioaccessibilité plus ou moins importantes sont observées : (1) une bioaccessibilité de Cd significativement plus faible dans la phase GI lorsque les solutions ont été conservées à 4°C pour l'échantillon 1 et à 20°C pour l'échantillon 2 ; (2) une bioaccessibilité de Pb plus importante dans la phase G après une conservation à 20°C tandis qu'elle est

plus faible pour l'échantillon 2 ; (3) une bioaccessibilité de Pb plus faible dans la phase GI pour l'échantillon 1 après une conservation à 37°C tandis qu'elle est plus importante pour l'échantillon 2.

Bilan : Les deux échantillons de terre sélectionnés pour cette expérimentation présentant des comportements différents pour une température donnée, il est difficile de proposer une explication. Cette étude montre néanmoins l'importance de se placer dans les mêmes conditions d'expérimentation (i.e. conserver les solutions digestives à une même température) afin d'avoir des résultats comparables.

b) Conservation des digestats

Les digestats obtenus à l'issue des phases G et GI du test UBM sont acidifiés et stockés à 4°C jusqu'à analyse. En raison de la complexité de la matrice, ils peuvent être conservés quelques jours (7 au maximum) et ceci, sans altérer les solutions et engendrer une modification de leurs concentrations en polluants métalliques. Dans l'objectif de disposer d'une conservation plus longue des digestats, l'effet d'une congélation a été évaluée sur les concentrations en Cd, Pb et Zn [**51**]. Cette expérimentation a été réalisée en partenariat avec le Laboratoire d'Analyse des Sols de l'INRA d'Arras. Les échantillons ont été congelés à -18°C puis des aliquots ont été décongelés 7 jours puis 14 jours plus tard. Les teneurs en Cd et Zn dans les solutions G et GI sont relativement stables dans le temps. En revanche, en milieu GI, des variations significatives des teneurs en Pb sont observées.

Bilan : L'acidification des digestats à l'issue du test UBM par ajout de quelques microlitres d'HNO₃ concentré puis, leur analyse dans les meilleurs délais a donc été la stratégie retenue.

c) Le pH dans la phase gastrique

L'étude de Wragg et al. (2011) a notamment mis en évidence que le pH est un paramètre majeur influençant les résultats de bioaccessibilité. D'après les auteurs, un contrôle plus strict du pH gastrique pourrait améliorer la reproductibilité de l'essai. Pour rappel, le pH dans la phase G doit être compris entre 1,2 et 1,7. Lors des essais sur la répétabilité/reproductibilité (*cf* § II.3.1.2.), j'ai montré que l'ajustement du pH à 1,50 \pm 0,05 améliore ces paramètres. Dans une nouvelle étape, j'ai étudié l'influence du pH gastrique sur la bioaccessibilité de Cd, Pb et Zn [18]. Dans cet objectif, trois valeurs de pH gastrique ont été testées : 1,2 - 1,5 - 1,7. Le test UBM a été réalisé sur trois sols urbains (nommés U1, U2 et U3) et trois sols agricoles contaminés (A1, A2 et A3) (Tableau I.9). Les résultats mettent en évidence que la dissolution des métaux dans les environnements gastrique et intestinal est fortement dépendant du pH. De manière générale, pour tous les échantillons de sols étudiés (urbains et agricoles), l'augmentation du pH de 1,2 à 1,7 implique : (1) aucune ou peu de variations des concentrations bioaccessibles en Cd dans la phase G (75 \pm 8% à pH 1,2, 73 \pm 7% à pH 1,5 et 74 \pm 8% à pH 1,7) mais une diminution des concentrations dans la phase GI (de 33 \pm 9% à pH

1,5 et 74 ± 8% à pH 1,7), mais une diminution des concentrations dans la phase GI (de $33 \pm 9\%$ à pH 1,2 à $30 \pm 5\%$ à pH 1,5 et $25 \pm 9\%$ à pH 1,7); (2) une diminution de la bioaccessibilité de Pb dans la phase G (de $69 \pm 10\%$ à pH 1,2 à $58 \pm 13\%$ à pH 1,5 et $52 \pm 6\%$ à pH 1,7) et des variations significatives dans la phase GI ($24 \pm 7\%$ à pH 1,2, $28 \pm 7\%$ à pH 1,5 et $25 \pm 6\%$ à pH 1,7); (3) une diminution des concentrations bioaccessibles en Zn dans la phase G (de $51 \pm 10\%$ à pH 1,2 à $47 \pm 11\%$ à pH 1,5 et $47 \pm 8\%$ à pH 1,7) et une légère augmentation de ces concentrations dans la phase GI ($de 16 \pm 9\%$ à pH 1,2 à $17 \pm 9\%$ à pH 1,5 et $17 \pm 8\%$ à pH 1,7). Les résultats sur Pb sont en accord avec d'autres études. Barltrop et al. (1975) avaient conclu que l'absorption du plomb par l'appareil gastro-intestinal était très dépendante du pH. Celle-ci serait également sensiblement augmentée lors d'une ingestion de terre à jeun, en raison d'un pH gastrique plus faible. Ruby et al. (1993) et Ruby et al. (1996) ont montré que la bioaccessibilité de Pb varie de 30 à 40% selon le pH de l'estomac et dépend également de l'état nutritionnel (l'ingestion de nourriture augmente le pH de l'estomac).

				1	1 0	1	, , ,	/ L _		
			Cd			Pb			Zn	
		pH 1,2	pH 1,5	pH 1,7	pH 1,2	pH 1,5	pH 1,7	pH 1,2	pH 1,5	pH 1,7
U1	Phase G	18,4±0,1 ^a	18,1±0,4 ^a	$18,2\pm0,2^{a}$	406±2 ^a	$349\pm2^{a,b}$	301 ± 5^{b}	1828±14 ^a	1701±6 ^a	1701±17 ^a
	Phase GI	5,9±0,1 ^a	5,3±0,1 ^b	3,7±0,1°	158±5 ^a	155±3 ^a	119±8 ^b	756±5 ^a	743±20 ^a	699±10 ^b
U2	Phase G	19,4±0,4 ^a	18,7±0,3 ^a	17,9±0,6 ^b	2281±11 ^a	1860±56 ^b	1673±21°	2584±77 ^a	$2450{\pm}14^{b}$	2359±42 ^b
	Phase GI	10,0±0,5 ^a	9,9±0,1 ^a	9,7±0,1 ^a	1253 ± 174^{a}	1384 ± 38^{a}	1198±29 ^a	1348±7 ^a	1311±24 ^a	1247 ± 20^{b}
U3	Phase G	21,5±0,5 ^a	20,9±0,6 ^a	$20,7{\pm}0,8^{a}$	1959±61 ^a	1731 ± 58^{b}	1409±89 ^c	1061±30 ^a	1005±39 ^a	985±53 ^a
	Phase GI	6,1±0,1 ^a	7,5±0,2 ^b	5,9±0,1 ^b	498±3 ^a	674±16 ^b	598±13 ^c	288±8 ^a	334±12 ^b	325±9 ^b
A1	Phase G	15,4±0,4 ^a	14,7±0,1 ^{a,b}	$14,4{\pm}0,2^{b}$	232±8 ^a	201 ± 2^{b}	179±4°	1342±24 ^a	1211±42 ^b	1172 ± 10^{b}
	Phase GI	7,4±0,1 ^a	6,8±0,1 ^b	7,0±0,2 ^{a,b}	76±5 ^a	94±9 ^b	$80\pm2^{a,b}$	476±12 ^a	521±55 ^a	546±14 ^a
A2	Phase G	3,8±0,1 ^a	4,0±0,1 ^a	$4,1\pm0,0^{a}$	189±2 ^a	97 ± 2^{b}	125±0 ^b	172±4 ^a	118±2 ^{a,b}	158±0 ^b
	Phase GI	2,4±0,1 ^a	1,7±0,1 ^b	1,5±0,1 ^c	62±6 ^a	76±21 ^a	82±12 ^a	5,3±0,3 ^a	12,8±1,0 ^b	14,6±0,6°
A3	Phase G	9,9±0,1 ^a	8,8±0,2 ^b	10,3±0,0 ^a	434±7 ^a	514 ± 45^{b}	392±0 ^a	418±11 ^a	472±15 ^b	421±0 ^a
	Phase GI	4,2±0,1 ^a	3,9±0,1 ^b	2,4±0,1°	120±22 ^a	120±5 ^a	120±4 ^a	85±1 ^a	113±1 ^b	135±2 ^c

Tableau I.9. Concentrations bioaccessibles (moyenne ± écart type exprimées en mg/kg) de Cd, Pb et Zn pour
des valeurs de pH dans la phase gastrique de 1,2, 1,5 et 1,7 [18]

a, b et c indiquent des différences significatives (ANOVA, test de Tukey, p<0,05) entre les trois valeurs de pH au sein des phases G et GI

Bilan : Cette étude montre que le pH gastrique est un paramètre sensible du test UBM. Globalement, il apparaît qu'à un pH plus faible (1,2), la mobilisation des métaux dans les solutions digestives augmente. De la même manière, Caboche (2009) a mis en évidence, pour un pH gastrique fixé à 1,20 \pm 0,05, de bonnes corrélations entre le test UBM et un modèle in vivo (le porcelet) pour As, Cd et Pb sur 15 sols ($R^2 > 0,89$ et pentes non significativement différentes de 1). Au regard de ces travaux, le groupe BARGE a fait le choix de fixer le pH gastrique à 1,20 \pm 0,05 dans l'objectif de déterminer une valeur de bioaccessibilité plus conservatoire afin de ne pas sous-estimer le risque.

I.3.2. Bioaccessibilité pulmonaire

Contrairement au test UBM simulant la digestion gastro-intestinale, il n'y a pas, à ce jour, de test *in vitro* unifié visant à déterminer la bioaccessibilité pulmonaire. Des tests ont d'ores et déjà été publiés dans la littérature mais méritent d'être confortés. Ces derniers sont souvent élaborés à partir de matériaux modèles dont la granulométrie n'est pas toujours représentative des particules inhalées. Un des verrous majeurs, en plus de la validation du test, est la métrologie amont qui doit permettre de recueillir suffisamment de matériau. Ainsi, au regard de la littérature, j'ai réalisé différents essais en partenariat avec le British Geological Survey (BGS) de Nottingham (UK) afin de définir un protocole [**31**]. La mise au point du test *in vitro* pulmonaire a consisté à faire varier deux paramètres, à savoir le volume de fluide et la composition du fluide pulmonaire. Dans les approches *in vitro*, il est nécessaire de tenir compte des contraintes expérimentales (balance suffisamment précise pour peser des quantités très petites de poussières) et analytiques. Aussi, pour assurer un réalisme aux extractions, j'ai évalué quatre ratios : 1/1000, 1/2000, 1/5000 et 1/10000, et ce, pour quatre fluides pulmonaires (PBS, Gamble, Gamble modifié et ALF). Concernant le temps de résidence, il a été fait le choix de retenir 24 h et ce, au regard des résultats présentés dans la littérature (Hofmann et Asgharian, 2003).

Les premiers essais ont été réalisés sur trois échantillons certifiés (NIST 2710a, BCR 723 et NIST 1648a) dont les caractéristiques sont présentées dans le Tableau I.10.

	NIST 2710a	BCR 723	NIST 1648a
(mg/kg)	sol (< 74 μm)	poussières de routes (< 90 µm)	poussières urbaines (< 100 μm)
Cd	12,3	2,5	73,7
Pb	5520	866	6550

Le principe du test (Figure I.7) repose sur une extraction chimique qui a consisté à placer dans un tube un échantillon de poussières certifié (10 mg), d'ajouter la solution simulant le fluide pulmonaire (10, 20, 50 et 100 mL de solution PBS, Gamble, Gamble modifié ou ALF ; Tableau I.11) et de placer le mélange à 37°C sous agitation pendant 24 h. Le mélange a ensuite été centrifugé, le surnageant récupéré, filtré et acidifié puis, conservé à 4°C jusqu'à analyse des concentrations bioaccessibles en Cd et Pb. Le dosage des métaux dans les digestats a été effectué en ICPAES par le BGS.



Figure I.7. Représentation schématique du protocole d'inhalation in vitro [50]

Composés	PBS	Gamble's solution	Gamble's solution modifiée	ALF
	g/L	g/L	g/L	g/L
NaCl	8,77	6,779	6,779	3,21
Na ₂ HPO ₄	1,28			0,071
NaHCO ₃		2,268	2,268	
Trisodium citrate dihydrate		0,055	0,055	0,077
NH ₄ Cl		0,535	0,535	
glycine		0,375	0,375	0,059
NaH ₂ PO ₄		1,872	1,872	
L-cysteine		0,121	0,121	
NaOH				6,0
citric acid				20,8
CaCl ₂ .2H ₂ O		0,026	0,026	0,128
Na_2SO_4				0,039
MgCl ₂ .6H ₂ O				0,050
Disodium tartrate				0,090
Sodium lactate				0,085
Sodium pyruvate				0,172
KH_2PO_4	1,36			
DPPC			0,01%	
pH	$7,3 \pm 0,1$	$7,3 \pm 0,1$	$7,3 \pm 0,1$	$4,5 \pm 0,1$

Tableau I.11. Composition des solutions pulmonaires utilisées lors du test in vitro

DPPC : dipalmitoylphosphatidylcholine

D'après Midlander et al. (2006, 2007), Colombo et al. (2008), Broadway et al. (2010)

I.3.2.1. Influence du milieu de dissolution sur la bioaccessibilité pulmonaire de Cd et Pb

J'ai étudié l'influence du milieu de dissolution sur la bioaccessibilité pulmonaire de Cd et Pb **[31]**. Les deux métaux présentent un comportement similaire avec les fluides pulmonaires étudiés quel que soit le ratio solide/liquide considéré. Aussi, j'ai fait le choix de présenter les résultats pour le ratio solide/liquide de 1/5000 (Tableau I.12).

		Cd (%)	Pb (%)
	PBS	<LD	< LD
BCD 722	Gamble	<LD	$7,8 \pm 0,6$
DCR-725	Gamble modifiée	$79,4 \pm 34,4$	$11,\!9\pm4,\!8$
	ALF	$81,\!4\pm17,\!6$	$62,0 \pm 3,2$
	PBS	$44,2 \pm 21,2$	$0{,}04\pm0{,}00$
NIST 2710s	Gamble	$93,\!6\pm29,\!7$	$7,9\pm0,4$
NIS I 2710a	Gamble modifiée	$97,2\pm11,7$	$7,1\pm1,5$
	ALF	$85,3 \pm 8,4$	$55,0\pm0,5$
	PBS	$21,1\pm6,\!2$	<ld< th=""></ld<>
MIST 16485	Gamble	$45{,}2\pm4{,}0$	$9{,}1\pm0{,}9$
11311040a	Gamble modifiée	$50,1\pm3,1$	$11,\!2\pm0,\!5$
	ALF	$65,6\pm5,5$	$75,9\pm2,2$

Tableau I.12. Concentrations bioaccessibles de Cd et Pb (moyenne \pm écart type en % de la concentration totale, n = 3) dans les échantillons certifiés pour les différents fluides pulmonaires testés (ratio S/L de 1/5000)

LD : limite de détection de l'ICPAES

Les résultats obtenus mettent en évidence :

- une fraction bioaccessible de Cd et Pb plus importante dans le fluide AFL. Ceci peut s'expliquer notamment par le pH. En effet, les solutions PBS et Gamble simulent des conditions « normales » pour un individu sain, le pH est alors ajusté à 7,3, tandis que la solution ALF simule le fluide interstitiel dans le cas d'une réaction immunologique du corps. Dans ce dernier cas, le pH est ajusté à 4,5. Le pH acide de la solution ALF entraîne une augmentation de la solubilité des éléments métalliques et donc une bioaccessibilité plus importante qu'à un pH neutre ;
- des différences entre PBS, Gamble et Gamble modifié, pour des pH similaires (7,3), indiquant l'influence de la composition chimique des fluides sur la bioaccessibilité ;
- une bioaccessibilité légèrement plus importante dans la solution Gamble modifiée que dans la solution Gamble et donc une augmentation de la solubilité des métaux étudiés avec l'ajout de DPPC ;
- des différences entre Cd et Pb indiquant que la bioaccessibilité pulmonaire dépend également de l'élément considéré et de sa spéciation. De manière générale, Cd est plus bioaccessible que Pb dans les conditions considérées.

I.3.2.2. Influence du ratio solide/liquide sur la bioaccessibilité pulmonaire

L'influence du ratio S/L sur la bioaccessibilité pulmonaire de Cd et Pb est présentée Figure I.8 pour les 4 solutions et les 4 ratios testés. Globalement, la solubilisation des métaux dans les solutions pulmonaires PBS, Gamble et Gamble modifiée augmente avec la diminution de la charge en particules de poussières (ratios plus faibles), tandis que la bioaccessibilité de Cd et Pb est relativement stable dans la solution ALF. Ces résultats montrent que pour les solutions PBS et Gamble, le ratio solide/liquide influence la dissolution. Pour ALF, la bioaccessibilité est indépendante des ratios considérés, à savoir de 1/1000 à 1/10000.

Sur le plan fondamental, il serait intéressant de prolonger les expérimentations avec les solutions PBS et Gamble en utilisant des ratios plus faibles (1/20000, 1/50000, 1/100000) et ceci, en vue de mettre en évidence une stabilisation de la bioaccessibilité et de permettre ainsi d'orienter le choix du ratio à mettre en œuvre. Se pose toutefois la contrainte de la faisabilité expérimentale, à savoir être en mesure de peser une masse de poussières très petite.



Figure I.8. Concentrations bioaccessibles de Cd et Pb (moyenne \pm écart type en %, n = 3) dans les échantillons certifiés pour les différents fluides pulmonaires en fonction du ratio solide/liquide. LD = limite de détection **[31]**

I.3.2.3. Choix du test

Au regard des résultats obtenus précédemment, j'ai fait le choix, pour les expérimentations futures sur les poussières, d'utiliser le fluide pulmonaire ALF pour les raisons suivantes :

- les ratios solide/liquide testés n'ont pas d'influence sur la bioaccessibilité de Cd et Pb ;
- la solubilité de Cd et Pb est plus importante dans ce fluide que dans les fluides PBS et Gamble, reflétant ainsi des conditions plus conservatoires ;
- avec son pH acide (4,5), ce fluide simule des conditions plus réalistes (réaction immunologique du corps humain en réponse à l'inhalation de poussières contaminées).

I.4. Vers une estimation de la biodisponibilité

Pour rappel, la biodisponibilité peut être interprétée comme un processus dynamique comprenant trois étapes distinctes :

• Etape 1 : Disponibilité environnementale

Elle correspond à la fraction du contaminant présent dans une matrice (eau, sol, sédiment...) potentiellement disponible pour des organismes et qui résulte des processus physico-chimiques de désorption (AFNOR, 2011);

• *Etape 2 : Biodisponibilité environnementale*

Il s'agit de la fraction du composé disponible dans l'environnement qu'un organisme absorbe par des processus physiologiques (Peijnenburg et al., 1997) ;

• *Etape 3 : Biodisponibilité toxicologique*

Elle correspond à la distribution, l'accumulation et/ou l'effet (toxique) du contaminant dans l'organisme (Gimbert, 2006).

Depuis 2008, la majorité de mes travaux de recherche ont porté sur l'Homme en vue d'approcher la biodisponibilité toxicologique au moyen de la bioaccessibilité. Les tests in vitro de digestion gastrointestinale apportent une information sur la proportion de contaminant soluble dans les fluides digestifs qui est potentiellement disponible pour l'absorption. Ces tests ne prennent pas en compte le transport des ions à travers les barrières biologiques. Le transport des éléments métalliques est fortement dépendant de leurs formes physico-chimiques (i.e. leur spéciation ; Campbell, 1995). Les ions métalliques libres peuvent se lier et/ou traverser la membrane intestinale. A l'exception des complexes organométalliques hydrophobes, les complexes métalliques ne sont pas capables de traverser la membrane. En supposant que seuls les ions libres peuvent être transportés à travers l'épithélium intestinal, la dissociation de certains complexes doit être prise en compte (Van Leeuwen, 1999). En conséquence, les cinétiques des processus d'association et de dissociation des complexes métalliques jouent un rôle clé. Dans certains cas, les complexes métalliques peuvent être dissociés et les ions métalliques libres produits sont ensuite transportés à travers la membrane. Ainsi, avoir une information sur la spéciation des métaux dans les fluides gastro-intestinaux pourrait aider à comprendre leur disponibilité pour le transport à travers l'épithélium intestinal. Dans cet objectif, plusieurs études (e.g., cellules Caco-2, dialyse) ont été recensées dans la littérature avec pour objectif de simuler l'épithélium intestinal humain (Huang et al., 2000 ; Bosscher et al., 2001 ; Oomen et al., 2003c; Chan et al., 2007). Dans une approche similaire, mes travaux ont consisté à étudier la faisabilité de l'utilisation d'un outil physico-chimique, la DGT (Diffusive Gradient in Thin films), pour évaluer la part de métaux bioaccessibles dans le fluide gastro-intestinal capable de traverser la membrane intestinale [18, 19]. Avant d'exposer mes travaux sur la « biodisponibilité toxicologique » réalisés au LGCgE-ISA Lille, j'ai fait le choix de présenter le principe de la technique DGT et les résultats obtenus à l'IRSN sur la « biodisponibilité environnementale » de l'uranium dans différentes matrices (eau, sédiments, sols) [38, 39, 54].

I.4.1. Théorie et principe de la mesure DGT

Davison et Zhang (1994) ont proposé une technique de mesure de l'ion libre et de son cortège de complexes labiles permettant de s'affranchir d'un certain nombre de difficultés liées aux techniques classiques telles que la voltampérométrie, les électrodes spécifiques ou la polarographie (problèmes de limites de détection pour les faibles concentrations, calibrations délicates, manque de sensibilité, problèmes pour les mesures in situ). La DGT repose sur un système de concentrations des cations sur une résine complexante après diffusion contrôlée (Figure I.9), ce qui permet de mesurer des quantités très faibles. C'est un dispositif formé d'une résine et d'un gel maintenus accolés et plongés dans la solution à analyser. Les échanges avec la solution extérieure ne peuvent avoir lieu que par la surface du gel. Les espèces métalliques migrent au travers du gel qui possède des caractéristiques physicochimiques bien déterminées et proches de celles de l'eau (gel polyacrylamide branché avec un dérivé d'agarose). A l'une des extrémités de ce gel, des grains de résine échangeuse d'ions Chelex-100 (emprisonnés dans un gel similaire) piègent les ions libres par la formation d'un complexe très stable entre les groupes fonctionnels iminodiacétates et les cations métalliques. Il s'établit en quelques minutes un gradient de concentration pour l'ion libre entre la solution, où la concentration est non nulle, et le voisinage de la résine, où la concentration est nulle. Ce gradient de concentration induit un flux de diffusion de l'ion libre depuis la solution vers la résine, proportionnel à la différence des concentrations, c'est-à-dire proportionnel à la concentration dans la solution (Davison et Zhang, 1994).



Figure I.9. Montage du dispositif DGT et représentation schématique du mécanisme de la DGT immergée en solution (d'après Tusseau-Vuillemin et al., 2003)

Le gel est séparé de la solution par une couche de diffusion dont l'épaisseur δ dépend de la forme de l'écoulement du fluide (en général 10 à 100 µm dans des eaux de rivières ou dans la mer). L'épaisseur de cette couche est souvent négligée par rapport à celle du gel (Δg) qui est de l'ordre du mm (Davison et Zhang, 1994). Si $\Delta g \gg \delta$, la loi de diffusion de Fick permet de relier le flux *F* d'un métal donné à sa concentration *C* en solution :

$$F = -D\frac{\partial C}{\partial x} = \frac{D(C-0)}{\Delta g}$$

où D est le coefficient de diffusion du métal dans le gel. Le flux F est aussi défini par :

$$F = \frac{M}{At}$$

où M est la masse de métal ayant diffusé à travers l'aire A de gel après un temps t. Finalement, la concentration dans la solution de départ est exprimée par :

$$C = \frac{M \Delta g}{t A D}$$

La masse accumulée est déterminée en éluant le métal de la résine avec de l'acide nitrique et en mesurant la concentration dans l'éluat. Des niveaux très faibles de pollution métallique peuvent ainsi être mesurés, puisque la masse de métal recueillie sur la résine est proportionnelle au temps. De plus, une connaissance des coefficients de diffusion est essentielle pour utiliser la DGT.

I.4.2. Caractérisation des complexes labiles

On considère un système métal-ligand avec le cation M^{2+} , le ligand L^{2-} et le complexe ML. Les concentrations relatives en solution ($[M_s]$, $[L_s]$ et $[ML_s]$) vérifient l'équation 1, où K ((mol/L)⁻¹) est la constante de stabilité, k_{dis} (s⁻¹) et k_f ((mol/L)⁻¹ s⁻¹) sont respectivement les constantes de vitesse de dissociation et de formation de ML.

$$ML \leftrightarrow M^{2+} + L^{2-}$$

$$\frac{[ML_s]}{[M_s][L_s]} = K = \frac{k_f}{k_{dis}} \tag{1}$$

Pour chaque complexe métallique, la vitesse à laquelle le métal est accumulé sur la résine est proportionnelle à la concentration en métal libre dans la solution, majorée d'une fraction de métal complexé en solution. Davison et Zhang (1994, 1995) ont proposé et vérifié expérimentalement que l'accumulation du métal total sur la résine à l'état stationnaire est linéaire avec le temps. Ces études ont permis de discuter la signification des mesures DGT selon la labilité de *ML* à l'interface avec la résine ([ML_N]) (Tusseau-Vuillemin et al., 2003). Il existe trois scénarios possibles :

• $1^{er} cas : [ML_N] \sim 0$

Le flux de diffusion est proportionnel à la concentration en métal total dans la solution. Le complexe est totalement labile et mesuré par la DGT.

• $2^{\text{ème}} \operatorname{cas} : [ML_N] = (1-\xi) [ML_s]$

où ξ caractérise la labilité du complexe. La concentration en métal est plus élevée que la concentration en métal libre et plus basse que la concentration en métal total. Le complexe ML est partiellement labile.

• $3^{\text{ème}} \text{ cas} : [ML_N] = [ML_s]$

La vitesse à laquelle le métal est accumulé sur la résine est proportionnelle à la concentration en métal libre en solution. Le complexe ML est inerte et non mesuré par la DGT.

Pour un complexe donné, la labilité augmente lorsque la constante cinétique de dissociation ou le temps de résidence du métal complexé à l'intérieur du gel augmente (i.e., par augmentation de l'épaisseur du gel de migration ou par diminution du coefficient de diffusion du complexe ML). Pour déterminer les concentrations en métal libre dans les systèmes aquatiques par l'utilisation de la DGT, il est nécessaire de prendre en compte la présence des ligands avec leurs propriétés complexantes. Le dispositif DGT présente l'avantage de mesurer à la fois l'ion libre et également son cortège de complexes labiles. Dans ce contexte, il parait donc intéressant de préciser la représentativité de la mesure du métal labile par rapport au métal biodisponible.

I.4.3. Méthodologie

I.4.3.1. Dispositif expérimental

Les cellules DGT, ainsi que les gels diffusifs et les résines Chelex-100 qui composent la DGT, ont été obtenus auprès du Dr. Hao Zhang (DGT Research, Landcaster, GB). L'ensemble de la DGT a été suspendu à l'aide d'un fil propre de Téflon, pendant un temps donné dans des béchers en polycarbonate contenant les solutions à tester. Les expériences ont été réalisées en duplicat pour les essais sur l'uranium (2 DGT par bécher) et en triplicat pour les essais dans les solutions digestives (3 DGT par bécher) sous une agitation suffisante en contrôlant la température et le pH des solutions à l'instant initial et final ; le pH des solutions devant être compris entre 5 et 11 (Gimpel et al., 2001). Après exposition, les DGT sont démontées. Les résines Chelex sont placées dans des tubes propres en polypropylène pour l'élution dans 1 mL d'acide nitrique 1 M pendant au moins 12 heures. Hormis le fait que l'acide permet la désorption des métaux fixés sur la résine, celui-ci permet également de s'affranchir des problèmes de conservation et d'adsorption des métaux sur les parois du flacon. Les concentrations en métaux sont ensuite mesurées dans l'éluat.

I.4.3.2. Mesure du métal labile et total

Les métaux s'accumulent sur la résine à une vitesse proportionnelle à la concentration en métaux labiles dans la solution. La masse de métal fixée dans la résine est obtenue par le calcul suivant, après élution dans l'HNO₃ :

$$M = \frac{C_e(V_{HNO_3} + V_{res})}{f_e}$$

où C_e correspond à la concentration en métal dans l'éluat (µg/L), V_{HNO3} le volume d'élution (mL), V_{res} le volume de la résine (estimé à 0,16 mL) et f_e le rendement de l'élution (80% pour Cd, Pb et Zn ; Buzier et al., 2006a et 67,8% pour U ; Li et al., 2006). La concentration en métal labile mesurée par la technique DGT est déterminée grâce à la formule présentée précédemment (*cf.* § II.4.1), à savoir :

$$C_{DGT} = \frac{M\Delta g}{tAD}$$

L'épaisseur Δg du gel utilisé est classiquement de 0,8 mm auquel il convient d'ajouter 0,13 mm lors de l'utilisation d'un filtre. L'aire A du gel est de 3,14 cm². Dans ce calcul intervient également le coefficient de diffusion D de l'élément dans le gel (cm²/s). Pour Cd, Pb et Zn, les valeurs des D sont fournies par DGT Research (Lancaster, UK ; <u>http://www.dgtresearch.com</u>) et dépendent de la température (valeurs pour des températures allant de 1 à 35°C). Dans le cas de l'uranium, D est dépendant du pH. Des études ont mis en évidence une diminution de D lorsque le pH augmente (Figure I.10 ; Garmo et al., 2003 ; Li et al., 2006). Ainsi, pour les expérimentations réalisées sur cet élément, le coefficient de diffusion de U a été calculé à partir de la droite de régression obtenue et ce, suivant le pH des solutions testées.



Figure I.10. Evolution du coefficient de diffusion D de l'uranium suivant les valeurs de pH (à 23°C) [54]

Pour l'ensemble des expérimentations, des prélèvements (5 mL d'échantillon acidifié à 1% avec HNO_3 69%) ont été réalisés en triplicat à l'instant initial puis aux différents temps d'exposition des DGT en vue de déterminer la concentration totale en métal.

I.4.4. Etude de faisabilité de l'utilisation de la DGT pour évaluer la biodisponibilité de l'uranium dans l'eau

Cette étude a consisté à : (1) tester la validité de la mesure DGT en solution contrôlée (eau en présence d'un gradient d'uranium dissous) ; (2) étudier la variation de la labilité dans différents milieux (en matrices organiques et inorganiques artificielles en présence d'uranium dissous ; (3) étudier la variation de la labilité pour un ligand donné en testant différentes épaisseurs de gels **[38, 39, 54]**.

I.4.3.1. Tests de validité de la DGT en matrice simple

Les expérimentations (Figure I.11) ont consisté à valider la technique DGT dans une matrice simple (solution de NaNO₃ à 0,01 M) en présence d'un gradient d'uranium dissous (de 10 à 500 μ g/L). Pour chaque concentration en U, différents temps d'immersion des DGT ont été testés (3 h – 6 h – 24 h – 48 h). Le calcul de la spéciation chimique de l'uranium dans les différentes conditions a été réalisé à l'aide du logiciel JCHESS (Denison et Garnier-Laplace, 2005). Les espèces prédominantes sont UO_2^{2+} , UO_2OH^+ et $UO_2(OH)_2$ (aq). Les concentrations en uranium ont été mesurées par la méthode des ajouts dosés par spectrofluorimétrie laser à résolution temporelle (Molecular Device Gemini XS).



Figure I.11. Expérimentations en milieu contrôlé : conditions et paramètres mesurés. JCHESS : logiciel de spéciation (Denison et Garnier-Laplace, 2005)

En pratique, les concentrations U_{DGT} ont été calculées de manière précise en prenant en compte quatre mesures à quatre durées d'immersion différentes. Une régression linéaire a été effectuée sur la masse M d'uranium accumulée sur la résine en fonction du temps d'immersion. Ces régressions sont présentées Figure I.12 pour les différentes expériences. La valeur estimée de la pente de la droite M = f(t) permet d'obtenir une valeur moyennée de U_{DGT} sur les différentes durées d'immersion et de détecter les éventuelles valeurs aberrantes dues à une erreur de manipulation ou d'analyse.



Figure I.12. Proportionnalité entre la masse d'uranium accumulée dans la résine et le temps d'immersion de la cellule DGT pour les différentes expériences [54]

Les concentrations DGT de l'uranium dans ces solutions en l'absence de ligand, calculées à partir de ces droites de régression, sont reportées sur la Figure I.13 pour chaque concentration d'uranium total. Une moyenne sur ces différentes mesures permet de déduire que les complexes hydroxylés et

carbonatés de l'uranium sont labiles à 98% dans cette matrice simple, dans les conditions opératoires choisies (pH = 5,6).



Figure I.13. Mesures DGT de l'uranium en matrice simple (NaNO₃ 0,01 M, pH = 5,6) sans ligand [54]

Bilan : Ces résultats montrent que, dans ces conditions, l'outil DGT est approprié pour la mesure des formes labiles de l'uranium dans l'eau.

I.4.3.2. Mesures DGT : labilité de différents complexes

Les essais (Figure I.14) ont consisté à étudier la variation de la labilité en présence de différents ligands (Na₂EDTA, citrate de sodium, carbonates NaHCO₃ et phosphates NaH₂PO₄) et ce, pour une concentration donnée en uranium dans une matrice NaNO₃ (0,01 M). Différents temps d'immersion des DGT ont également été réalisés (3 h – 6 h – 24 h – 48 h). Pour chaque ligand, différentes concentrations ont été testées afin de faire varier le ratio métal/ligand (U/L).



Figure I.14. Expérimentations en milieu contrôlé en présence de ligands : conditions et paramètres mesurés

Les pourcentages d'uranium inorganique et complexé au ligand étudié ont été estimés au moyen du logiciel de spéciation JCHESS. La Figure I.15 présente l'exemple de la spéciation de l'uranium en présence d'ETDA.



Figure I.15. Spéciation de l'uranium en présence d'ETDA (matrice NaNO₃ 0,01 M, [U] = 400 μ g/L, [EDTA] = 1.10⁻⁶ et 1.10⁻⁵ M) [54]

Pour chaque condition expérimentale testée, ont été comparées la mesure DGT (U_{DGT}), la concentration en uranium inorganique (U_{inorg}) estimée avec JCHESS (i.e. la concentration en uranium non complexé par le ligand étudié) et la concentration en uranium total mesurée (U_{total}) (Figure I.16).



Figure I.16. Mesures DGT dans une matrice simple (NaNO₃ 0,01 M) en présence d'uranium (400 μg/L pour EDTA, citrate et carbonates et 30 μg/L pour phosphates) et d'un ligand (EDTA, citrate, carbonates ou phosphates à différentes concentrations) [54]

En présence d'EDTA et pour les ratios U/EDTA de 6,0 et 1,7, les concentrations d'uranium labile mesurées par la DGT sont inférieures ou égales aux concentrations totales et ne sont pas significativement différentes des concentrations en uranium inorganique estimées par JCHESS. Pour ces deux conditions, les complexes U-EDTA sont donc inertes vis-à-vis de la DGT. Concernant les ratios de 0,2 et de 0,02, les complexes U-EDTA sont partiellement labiles puisque la DGT mesure une fraction élevée d'uranium en plus de la fraction inorganique. 56% et 80% des complexes U-EDTA sont labiles respectivement pour les ratios de 0,2 et de 0,02.

Dans le cas d'un ratio U/citrate de 10,2, la DGT mesure une fraction qui correspond à U_{inorg} . Les complexes U-citrate n'apparaissent donc pas labiles dans ces conditions expérimentales. Par contre, pour les ratios plus faibles, les complexes sont labiles en grande partie. Dans le cas où le ratio est de 3,5, la DGT mesure une fraction élevée d'uranium en plus de la fraction inorganique et 67% des complexes U-citrate sont labiles. Pour des rapports de 0,2 et de 0,02, 70% des complexes sont labiles.

Les essais avec les carbonates montrent que 80% et 90% des complexes formés, respectivement pour les ratios U/L de 0,02 et de 0,003, sont labiles.

De la même manière que pour les carbonates, 67% et 83% des complexes U-phosphates formés, respectivement pour les rations U/L de 0,01 et de 0,001, sont labiles. En effet, la DGT mesure une fraction élevée d'uranium en plus de la fraction inorganique.

Bilan : Comme attendu, les complexes U-carbonates sont les plus labiles. Pour les trois autres ligands étudiés (phosphates, citrate et EDTA), les complexes U-L sont partiellement labiles. De plus, pour les quatre ligands, la labilité augmente lorsque le ratio U/L diminue. Des résultats similaires ont été observés pour le cuivre par Tusseau-Vuillemin et al. (2004).

I.4.3.3. Influence de l'épaisseur du gel de la DGT sur la labilité des complexes U-L

Les gels de diffusion utilisés classiquement sont des gels de type open-pore et d'épaisseur (Δg) 0,8 mm. Les deux expérimentations présentées précédemment ont été réalisées à partir de ces gels. Dans le cas des essais avec l'EDTA et le citrate, des mesures DGT ont également été effectuées avec des gels d'épaisseur 0,4 et 2,0 mm afin de comparer les résultats avec ceux obtenus avec l'épaisseur 0,8 mm (Figure I.17). Ces trois types de gels ont la même composition, seule l'épaisseur change. Les concentrations en ligands ont été fixées à 1.10⁻⁵ mol/L, le ratio U/L étant d'environ 0,2



Figure I.17. Expérimentations en milieu contrôlé en présence de ligands : conditions et paramètres mesurés

Pour chaque condition expérimentale testée, ont été comparées la mesure DGT (U_{DGT}), la concentration en uranium inorganique (U_{inorg}) et la concentration en uranium total (U_{total}) (Figure I.18).


Figure I.18. Mesures DGT dans une matrice simple (NaNO3 0,01 M) en présence d'uranium (400 μ g/L) et d'un ligand (EDTA ou citrate à 1.10-5 mol/L) pour différentes épaisseurs Δg de gels diffusifs [54]

Ces résultats montrent de façon significative que l'épaisseur du gel diffusif a une influence sur la labilité des complexes U-EDTA et U-citrate. Pour les essais avec l'EDTA, les pourcentages de complexes labiles sont de 44, 56 et 88% respectivement pour les gels d'épaisseurs 0,4, 0,8 et 2,0 mm. De la même manière pour les essais avec le citrate, les pourcentages de complexes labiles sont de 60, 70 et 100% respectivement pour les gels 0,4, 0,8 et 2,0 mm. Pour un Δg de 2,0 mm, et dans les conditions opératoires choisies, les complexes U-citrate sont totalement labiles.

Bilan : L'épaisseur du gel de diffusion a une influence sur la labilité des complexes U-EDTA et Ucitrate. En effet, la labilité des complexes augmente lorsque l'épaisseur du gel augmente, c'est-àdire lorsque le temps de résidence de l'uranium complexé à l'intérieur du gel augmente.

Perspectives

Ce travail, objet de mon 1^{er} postdoc, a été la première étape dans l'étude de la faisabilité de l'utilisation de la DGT pour évaluer la biodisponibilité de l'uranium [54]. Dans le prolongement de mon travail, les étapes suivantes ont consisté à : (1) comparer ces résultats à des modèles ; (2) réaliser des expérimentations en matrice organique naturelle (substances humiques) ; (3) réaliser des expérimentations en milieux plus complexes (eaux naturelles, sédiments, sols) [38] ; (4) tester d'autres types de gel, notamment des gels restrictifs (taille des pores < 1 nm) ; (5) effectuer des biotests pour relier la mesure DGT à la toxicité observée.

I.4.5. Etude de faisabilité de l'utilisation de la DGT pour évaluer la spéciation de Cd, Pb et Zn dans les fluides gastro-intestinaux

La technique DGT est très largement utilisée dans les eaux (e.g., Davison et Zhang, 1994 ; Zhang et Davison, 2000 ; Scally et al., 2006 ; Ruello et al., 2008 ; Han et al., 2013 ; Buzier et al., 2014) ainsi que dans les sédiments ou les sols (e.g., Zhang et al., 1995 ; Harper et al., 2000 ; Roulier et al., 2008 ; Agbenin et Welp, 2012 ; Bade et al., 2013). Des travaux ont également été entrepris sur les eaux usées (Buzier et al., 2006b ; Buzier et al., 2008 ; Yapici et al., 2008). L'objectif de ce travail était de tester cet outil physico-chimique dans un autre milieu complexe, à savoir les fluides gastro-intestinaux. La méthodologie et les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication **[19]** insérée ci-dessous.

Pelfrêne A., Waterlot C., Douay F., 2011. Investigation of DGT as a metal speciation tool in artificial human gastrointestinal fluids. Analytica Chimica Acta 699, 177-186.

En résumé...

Cette étude (Figure I.19) a consisté à : (1) tester la validité de la mesure DGT en solution contrôlée (solution gastro-intestinale à 25°C en présence d'un gradient de Cd, Pb et Zn) ; (2) évaluer la validité

de la mesure DGT (à 25°C et à 37°C) après réalisation du test UBM sur un sol contaminé ; (3) réaliser le test UBM sur 6 échantillons de sols contaminés et mesurer les concentrations labiles de Cd, Pb et Zn au moyen de la DGT. Pour chaque condition expérimentale testée, ont été déterminées les concentrations totales en métaux (i.e. fraction bioaccessible) ainsi que les fractions particulaires et dissoutes (après filtration).



Figure I.19. Représentation schématique des expérimentations menées sur la technique DGT et des paramètres mesurés : A. dans la solution gastro-intestinale dopée en métaux ; B. dans le chyme à l'issue du test UBM. JESS (the Joint Expert Speciation System ; May et Murray, 1991a, 1991b, 1993)

Au bilan :

les essais valident l'utilisation de l'outil DGT pour mesurer la labilité de Cd, Pb et Zn à 25°C dans les fluides digestifs dopés avec ces métaux et ce, pendant un temps d'immersion de 6 h. Plus spécifiquement, les complexes métalliques sont labiles à 68% pour Cd, à 3,8% pour Pb et à 40% pour Zn. Dans cette matrice, les complexes sont donc principalement labiles pour Cd (sous forme de chlorosulfate de Cd), principalement inertes pour Pb (sous forme de complexes phosphatés) et présentent un comportement intermédiaire pour Zn (présent sous forme d'ions libres et de complexes carbonatés et phosphatés);

- les essais valident l'utilisation de l'outil DGT pour mesurer la labilité de Cd, Pb et Zn à 25°C et à 37°C dans les fluides digestifs après la réalisation du test UBM sur un sol contaminé. Plus spécifiquement, l'introduction de sol diminue la labilité des métaux. De plus, lorsque la température augmente de 25 à 37°C, la fraction particulaire des métaux augmente et la labilité diminue ;
- pour les six sols étudiés, la bioaccessibilité des métaux a fourni une mesure de leur solubilité dans le tractus gastro-intestinal. Seule une fraction des composés bioaccessibles peut être transportée à travers l'épithélium intestinal. Ainsi, la technique DGT a été utilisée pour extrapoler cette fraction et l'absorption gastro-intestinale estimée varie de 8 à 30% pour Cd, de 0,6 à 11% pour Pb et de 0,8 à 7% pour Zn.

La DGT est un outil simple, efficace et fiable pour évaluer la spéciation des métaux dans les fluides digestifs. La combinaison du test UBM, de la technique DGT et du logiciel JESS représente une nouvelle approche pour estimer les espèces métalliques disponibles pour le transport à travers l'épithélium intestinal. Les données expérimentales obtenues sont globalement en accord avec celles déterminées avec d'autres modèles utilisés dans la littérature pour simuler la membrane intestinale. Néanmoins, une comparaison avec un modèle in vivo doit être considérée pour valider ces données. Les résultats suggèrent que la biodisponibilité de Cd, Pb et Zn est dépendante de leur forme et de leur solubilité ainsi que des paramètres physico-chimiques de la matrice ingérée. ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta



journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

Investigation of DGT as a metal speciation tool in artificial human gastrointestinal fluids

Aurélie Pelfrêne^{a,b,*}, Christophe Waterlot^{a,b}, Francis Douay^{a,b}

^a Université Lille Nord de France, Lille, France

^b Groupe ISA, Equipe Sols et Environnement, Laboratoire Génie Civil et géo-Environnement Lille Nord de France (LGCgE, EA 4515), 48 boulevard Vauban, 59046 Lille Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history: Received 22 December 2010 Received in revised form 11 May 2011 Accepted 14 May 2011 Available online 23 May 2011

Keywords: Trace elements Digestive fluids Bioaccessibility Diffusive gradient in thin film Computer modeling Absorption

ABSTRACT

This paper reports the results of an investigation on the performance of the diffusive gradient in thin film technique (DGT) as a speciation tool for trace elements (TEs) in artificial human gastrointestinal fluids. The validity of Cd, Pb, and Zn sampling by DGT in digestive fluids was checked. The TE bioaccessibility in highly contaminated soils was determined using the *in vitro* Unified Barge Method (UBM) test. DGT devices were deployed in the gastrointestinal solutions obtained after carrying out the UBM test. The computer speciation code JESS (Joint Expert Speciation System) was used to predict the metal speciation of Cd, Pb, and Zn. Combining the *in vitro* test with the DGT technique and JESS provided an approach to the TE species available for transport across the intestinal epithelium. The gastrointestinal absorption of ingested TE ranged from 8 to 30% for Cd, 0.6 to 11% for Pb, and 0.8 to 7% for Zn and was influenced by TE speciation of TE chemical speciation in digestive fluids. Extrapolation to the *in vivo* situation should be undertaken very cautiously and requires further investigation.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The accumulation of trace elements (TEs) in soils due to human activities constitutes a potential health risk if directly ingested. Ingestion of contaminated soil particles is a major route for human TE intake, especially by children via hand-to-mouth behavior [1–3]. Contaminants can be partially or totally released from soil by ingestion, depending on their speciation under gastrointestinal conditions [4]. The fraction of bioavailable TE is given by the total amount of elements that reaches the bloodstream and human organs [5]. The two limiting factors in oral TE bioavailability are dissolution and absorption [6]. Dissolution of ingested TEcontaining soil particles is often estimated using in vitro tests (artificial saliva-gastrointestinal fluids) as surrogates for in vivo measurements [e.g., [7–10]]. In vitro tests provide estimates of bioaccessibility, which corresponds to the proportion of contaminant that dissolves in the artificial gastrointestinal fluids and is potentially available for absorption [4,5,11]. These tests do not take into account the transport of ions across biological barriers [12]. The transport of TEs across biological membranes is highly dependent on the physicochemical form of the metal, i.e., its speciation [13]. The free metal ions can bind to and/or traverse

E-mail address: a.pelfrene@isa-lille.fr (A. Pelfrêne).

the intestinal membrane. Apart from exceptions (e.g., hydrophobic organometal complexes), metal complexes are not able to overcome the membrane as a whole. Assuming that only the free metal ions can be transported across the intestinal epithelium, a contribution from complexed forms to metal transport across the membrane via their dissociation should also be taken into account [14]. As a consequence, the kinetics of association and dissociation processes of metal complexes play a key role. In some cases, metal complexes can be dissociated, and the free metal ions produced are subsequently transported across the membrane [14]. The flux toward the intestinal membrane corresponds to both the free metal ion and labile metal species. In contrast, inert species cannot dissociate and thus do not contribute to transport across the intestinal membrane [14]. As a consequence, obtaining direct information on metal speciation in the gastrointestinal fluids could greatly help understand TE availability for transport across the intestinal epithelium. Within this objective, a number of studies were conducted in order to simulate human intestinal epithelium. Human enterocyte cell lines, such as the Caco-2 line, have been explored as a suitable absorption phase [15,16]. An alternative to Caco-2 cells, digestion in dialysis tubing, is a technique used in studies estimating TE bioaccessibility in soils and food [17–19].

In the present study, transport of bioaccessible Cd, Pb, and Zn across the intestinal epithelium was investigated using the diffusive gradient in thin film technique (DGT) as a model to simulate human intestinal membrane. The DGT technique was proposed by Davison and Zhang [20] as a convenient speciation tool for the

^{*} Corresponding author at: Groupe ISA, Université Lille Nord de France, Lille, France. Tel.: +33 3 28 38 48 48; fax: +33 3 28 38 48 47.

^{0003-2670/\$ -} see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved. doi:10.1016/j.aca.2011.05.024

assessment of bioavailable TEs [21-23]. This method is based on the selective diffusion and dissociation of metal species within a gel and measures concentrations of labile TE [24,25]. Colloidal and particulate TEs are excluded due to size restrictions of the gel. DGT is being increasingly used in the determination of TE speciation in a wide variety of media such as natural waters [e.g., [20,22,26-30]], soils [e.g., [31-33]], and sediments [e.g., [34-37]]. Recently, this technique was used in wastewaters [38-40]. Speciation results determined with DGT in synthetic solutions and natural waters may be compared to thermodynamic speciation calculations [41–44]. However, the thermodynamic databases of available models do not contain the different compounds present in the gastrointestinal fluids. The Joint Expert Speciation System (JESS) [45-47] has thus been developed to model chemical speciation in complex environments and can estimate interactions of the selected elements with the element-binding species present in the gastrointestinal system [48.49].

The soils investigated in the current study were sampled in northern France where smelting activities from the latter part of the 19th and through much of the 20th centuries have brought about extensive soil contamination by TEs [50–53]. The present original study focuses on: (i) the determination of TE bioaccessibility in soils using the *in vitro* UBM (Unified Barge Method) test [54]; (ii) the estimation of the applicability of DGT to determine TE speciation in gastrointestinal fluids; (iii) the comparison of the results given by DGT with those predicted by the chemical equilibrium model JESS; and (iv) the investigation of DGT as a tool to simulate TE species available for transport across the intestinal epithelium.

2. Materials and methods

2.1. Soil sampling and analysis

Soil samples used for both in vitro experiments and DGT method development were collected from seven locations at a site that was highly affected by the past atmospheric emissions of two lead and zinc smelters in northern France [50-53]. The sampled soils were chosen to represent a large scale of soil metal contamination. For each soil, a composite sample was constituted in the ploughed layer (0-25 cm) and it was prepared according to the NF ISO 11464 standard (for further details of standards see Appendix A). The soil samples were air-dried at a temperature below 40 °C and sieved to less than 250-µm particle size. The size fraction under 250 µm was chosen because predominantly smaller particles adhere to children's hands and are ingested [6]. Particle-size distribution was obtained through sedimentation and sieving (NF X31-107). Soil pH was measured in a water suspension (NF ISO 10390) and organic matter contents were obtained by the NF ISO 10694 standard. Total carbonate contents were obtained by measuring the volume of CO₂ released after a reaction with HCl (NF ISO 10693). Calcination at 450 °C and a mixture of hydrofluoric and perchloric acids, as described by the NF X 31-147 standard, were used for total dissolution of Cd, Pb, and Zn. The Zn and high concentrations of Cd and Pb were measured by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICPOES, Vista Pro, Varian, France). The low concentrations of Cd and Pb were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS, Série X2, Thermo, France). All these analyses were performed by the accredited INRA Soil Analysis Laboratory (Arras, France). The soil's physicochemical parameters are given in Table 1.

2.2. In vitro bioaccessibility measurement

The bioaccessibility of Cd, Pb, and Zn was measured on subsamples of the seven soils (Table 1). The *in vitro* test, based on the Unified Barge Method (UBM protocol) [54], was used to simulate the chemical processes occurring in the mouth, stomach, and intestine compartments using synthetic digestive solutions according to physiological transit times [55,56]. The UBM test was validated against an *in vivo* model (young swine) for Cd and Pb for the gastric and gastrointestinal extraction phases by Caboche [57]. Even if Zn could constitute a threat for human health [58,59], this element, in terms of bioaccessibility, is poorly documented in the literature [60] and has not been validated by the UBM test. It may be impossible to establish a relationship between UBM bioaccessible Zn and human bioavailable Zn because humans regulate uptake of excess Zn. In the present study, the soil samples were highly contaminated by Zn (Table 1) and the Zn bioaccessibility was also measured in the first approach when estimating human exposure.

First, 0.6 g of the under-250- μ m dried and homogenized soil sample was placed in a centrifuge tube and mixed with 9 mL of simulated saliva at pH 6.5 for 5 min; 13.5 mL of simulated gastric solution was added at pH 0.9–1.0 to give a final pH ranging from 1.2 to 1.7 and shaken end-over-end at 37 °C for 1 h. The digestion was switched to the intestinal phase by adding 27 mL of simulated duodenal fluid and 9 mL of simulated bile solution at pH 6.3 ± 0.5. The tubes were shaken end-over-end at 37 °C for 4 h and centrifuged at 3000 × g for 5 min. The resulting supernatant was removed and bioaccessible concentrations of Cd, Pb, and Zn were measured by atomic absorption spectrometry (AAS, AA-6800, Shimadzu, Japan) using a flame (FAAS). To evaluate analytical recovery, a blank and a NIST Standard Reference Material (2710) were used [55,56]. In the supernatants, Fe and Mn concentrations were also measured by FAAS.

2.3. Labile TE concentration determination

Labile TE concentrations were measured with the DGT technique [20,34]. The DGT devices consist of two gel layers. The chelating resin (Chelex-100, Na form, 200-400 mesh), which is supported in a layer of gel, is known as the resin gel layer. This resin is separated from the deployment solution by a further layer of polyacrylamide gel with well-defined diffusive properties. All DGT holders, Chelex-100 binding resins (0.4 mm thick) and diffusive gels (0.8 mm thick) were purchased from DGT Research (Lancaster, UK). Open-pore (pore size >5 nm) and restricted gels (pore size <1 nm) [24] were used simultaneously. These gels are composed of about 95% water. Open-pore gels have open structures that allow free diffusion of simple metal ions at the same rate as through liquid water. Organic molecules with molecular weights up to 100,000 Da can also diffuse through these gels, although with increasing retardation as size increases [24]. Restricted gels, with a much smaller pore size (<1 nm), retard the diffusion of organic substances much more markedly and slightly retard the diffusion of simple metal ions [27]. An additional cellulose ester filter membrane (Millipore, 0.13 mm thick) was used to separate the gel from the solution in order to protect it from adhering particles. The experiments were conducted in three phases:

- (a) Validation phase (Fig. 1A). The simulated gastrointestinal juice was prepared and spiked with a mixture of Cd, Pb, and Zn (certified standard of 1000 mg L⁻¹, C.P.A., Groupe A.C.S.D., Voisins le Bretonneux, France) to a concentration gradient (from 0.05 to 1.0 mg L^{-1} for Cd, from 5 to 30 mg L^{-1} for Pb, and from 1 to 10 mg L^{-1} for Zn). For each mixture (0.05–5–1 mg L⁻¹; 0.1–10–2 mg L⁻¹; 0.5–20–5 mg L⁻¹; 1.0–30–10 mg L⁻¹ for Cd–Pb–Zn, respectively), four DGT systems (open-pore gels) were deployed in 500 mL polypropylene beakers (stirred at 25 °C) for 3, 6, 24, and 30 h.
- (b) Second validation phase (Fig. 1B-1). The UBM test was carried out on one highly contaminated soil sample (named S0, Table 1) and

•	•								
	$Clay (g kg^{-1})$	Silt (g kg ⁻¹)	Sand $(g kg^{-1})$	рН	Total CaCO ₃ (g kg ⁻¹⁾	Organic matter (g kg ⁻¹)	Total Cd (mg kg ⁻¹)	Total Pb (mg kg ⁻¹)	Total Zn (mg kg ⁻¹)
S0	152	460	388	7.3	13	133	21.2	2867	6908
S1	189	505	306	8.0	33	48	22.9	536	3040
S2	232	428	340	7.2	33	136	30.2	3711	5830
S3	229	466	305	5.7	2	205	28.4	2497	1813
S4	227	507	266	8.1	5	59	18.1	306	2167
S5	333	586	81	8.3	280	41	5.5	269	405
S6	239	595	166	8.1	84	62	13.0	824	1060

 Table 1

 Physicochemical parameters of topsoil samples.

performed in 12 replicates. A previous study on repeatability and reproducibility [56] provided evidence for the quality of the UBM test for Cd, Pb, and Zn oral bioaccessibility measurements. The resulting supernatants (i.e., chyme) were pooled in 500-mL beakers (stirred), in which three DGT systems (open-pore gels) were deployed for 3 and 6 h. This experiment was conducted at 25 °C and 37 °C. DGT was investigated at 37 °C to simulate the human body's physiological conditions.

(c) *Third phase* (Fig. 1.B-2). The labile concentrations of Cd, Pb, and Zn in the gastrointestinal fluids were estimated. The UBM test was carried out on the soil samples S1–S6 (Table 1). As done during phase b, the test was performed in 12 replicates for each sample and the resulting supernatants were pooled in 500-mL beakers (stirred at 37 °C), in which three DGT devices (open-pore and restricted gels) were deployed for 3 h. The DGT technique was then investigated as a model to simulate the intestinal membrane.



Fig. 1. Schematic representation of the procedure of DGT device exposure to gastrointestinal fluids. (A) Gastrointestinal juice spiked with TEs for the first validation phase. (B) Procedure of an artificial digestion and exposure of DGT devices to chyme: (1) second validation phase at 25 °C and 37 °C (soil sample S0); (2) estimation of the labile TE concentrations in the gastrointestinal fluids (soil samples S1–S6).

Because of well-defined properties of Chelex-100 resin [34], which binds metal less efficiently at low pH (<5), no DGT system was deployed in the gastric solution (where $pH \le 1.7$).

After system retrieval, resins were eluted in 5 mL (V_e) of 1 M nitric acid (prepared from 70% nitric acid, J.T. Baker, Deventer, Netherlands). Eluates were analyzed by FAAS. The eluate concentration (C_e) was converted into the mass of metal accumulated on the resin (M) according to Eq. (1):

$$M = \frac{C_{\rm e}(V_{\rm g} + V_{\rm e})}{f_{\rm e}} \tag{1}$$

where V_g and V_e are the volumes of the resin gel and eluent, respectively, and f_e is the elution factor (80% for Cd, Pb, and Zn [38]).

The labile metal concentration C_{DGT} was calculated according to Eq. (2) [24]:

$$C_{\rm DGT} = \frac{M\Delta g}{tAD} \tag{2}$$

where *t* is the immersion time, Δg is the diffusive gel thickness (0.8 + 0.13 mm of the filter membrane), *A* is the exposure area of the device (3.14 cm²), and *D* is the diffusion coefficient of the metal (in cm² s⁻¹ provided by DGT Research, Lancaster, UK available at http://www.dgtresearch.com). Estimated errors on the labile metal concentration include the three replicates, AAS measurement deviation, and 5% error on $V_{\rm e}$, $f_{\rm e}$, Δg , *A*, and *D*.

Before and after immersion, pH and temperature were measured. For each experiment, 20 mL of solution was sampled for TE determination. An aliquot was filtered through 0.22- μ m membrane filters (polyethersulphone, Millex-GP, Millipore) in order to remove large floating particles and a high proportion of colloids. Total and dissolved metals (acidified with 1%, v/v of 70% nitric acid) were measured by FAAS. Particulate (particles and colloids) TE concentrations were calculated as the difference between total and dissolved concentrations. Finally, the procedure allowed total TEs to be fractionated in particulate (>0.22 μ m) and total dissolved (<0.22 μ m) metals.

2.4. Computer modeling of chemical TE speciation

JESS computer modeling (with the JESS Thermodynamic database, version 7.1), developed by May and Murray [45–47], was used to assess the TE chemical speciation in the gastrointestinal fluid. The composition of the gastrointestinal fluid was considered a combination of saliva, gastric, and duodenal juices, and bile [55,56]. The temperature, pH, total metal-ion and ligand concentrations measured in the digestive fluid (when the DGT systems were deployed) were used in the simulations. Table 2 shows the total concentrations of the digestive juice components used in these simulations. Bile salts, enzymes, and other proteins likely to be present in the digestive fluids were not included in the model due to insufficient information concerning their molar concentrations of the gastrointestinal juice components, some compounds provided by soil samples (S0–S6) were included in the simulation such as

Table 2

Total concentrations of the gastrointestinal juice components used to run chemical speciation models in JESS and iron and manganese concentrations measured in the digestive juices after carrying out the UBM test on the soil samples S0, S1, S2, S3, S4, S5, and S6.

Gastrointestinal juice comp	onents (mol L ⁻¹)
CO3 ²⁻	8.28×10^{-2}
PO4 ³⁻	$3.85 imes 10^{-3}$
SO ₄ ²⁻	$1.23 imes 10^{-3}$
NO ₃ -	$1.74 imes 10^{-2}$
SCN-	$6.33 imes10^{-4}$
Cl-	$2.13 imes 10^{-1}$
K ⁺	1.85×10^{-2}
Na ⁺	2.51×10^{-1}
Ca ²⁺	$2.80 imes 10^{-3}$
Mg ²⁺	$4.85 imes10^{-4}$
Urea	$4.50 imes10^{-3}$
Uric acid	$1.37 imes 10^{-5}$
Glucosamine	7.10×10^{-4}
	Concentrations (mol L ⁻¹)

	Iron	Manganese
SO	3.35×10^{-5}	3.04×10^{-5}
S1	4.07×10^{-5}	$3.07 imes 10^{-5}$
S2	$2.06 imes 10^{-5}$	$3.03 imes 10^{-5}$
S3	$9.40 imes10^{-5}$	$1.22 imes 10^{-5}$
S4	4.13×10^{-5}	$3.19 imes 10^{-5}$
S5	$2.73 imes 10^{-6}$	$1.83 imes 10^{-5}$
S6	$2.47 imes10^{-6}$	3.40×10^{-5}

iron and manganese contents (Table 2). In previous studies [55,56], sequential chemical extractions were carried out on soil samples collected in the studied area. The results showed that significant fractions of Cd, Pb, and Zn were found in the reducible fraction, which is thought to be adsorbed or occluded by iron and manganese oxides. The presence of iron and manganese also probably influence the speciation pattern. However, further studies are needed to establish the influence of such elements (such as organic matter) on the speciation of TEs. Iron and manganese concentrations in the digestive juices were analyzed using FAAS.

2.5. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using STATISTICA (Statsoft, Tulsa, OK, USA) or XLSTAT 2009.4.06 (Addinsoft). ANOVA analyses were carried out to assess a difference in TE concentration values measured by DGT with open-pore and restricted gels using the Tukey test (p < 0.05). The correlation coefficients were calculated by means of the Pearson method. Statistical analyses were carried out on three replicates.

3. Results and discussion

3.1. Validity of labile metal measurement using DGT in artificial human gastrointestinal fluids

3.1.1. DGT performance in digestive juices spiked with Cd, Pb, and Zn

The validity of metal sampling using DGT (TE accumulation stability and accumulation linearity) in gastrointestinal fluids (at 25°C) spiked with a mixture of Cd, Pb, and Zn to various concentrations was first investigated for 3, 6, 24, and 30 h (Fig. 2). The equation that predicts that the accumulated mass of TE on DGT resins is proportional to immersion time was assessed. The TE accumulation over 30 h of exposure was stable for Zn, whereas the accumulated mass of Cd and Pb was higher at the beginning of the deployment and decreased after 6 h (Fig. 2A). The linearity of Zn accumulation indicated good correlations up to 30 h (Fig. 2B). In contrast, the linearity of Cd and Pb accumulation was obtained only up to 6 h of exposure. The artificial digestive fluid is a very complex matrix and after many hours of deployment of DGT devices, a film had developed on the surface of the filter membrane. The formation of this film could interfere with the diffusion properties of the gel and thus prevent the reactive TEs from passing through the filter. This hypothesis could explain the results obtained for Cd and Pb, but not those for Zn. The fall-off on the DGT response for Cd and Pb at longer exposure times could also be explained by saturation of the resin with competing ions. The selectivity of the Chelex-100 resin for any particular system depends on presence



Fig. 2. Mass of TE accumulated on DGT resins after various immersion times (at 25 °C) in the artificial gastrointestinal juice spiked with a mixture of Cd, Pb, and Zn at various concentrations. (A) Assessment of TE accumulation stability. (B) Assessment of TE accumulation linearity. Mean values and standard deviations of three replicate devices are given.



Fig. 3. Correlations between TE concentrations measured by DGT and total TE concentrations measured in the deployment solution. Mean values and standard deviations of three replicate devices are given.

of other complex-forming species according to the pH and/or ionic strength values [61,62]. The thermodynamically stable complexes will not react appreciably with the Chelex resin. Some elements such as Hg²⁺ appear high in the selectivity series in the presence of nitrate ions, but low in the series in the presence of chloride ions, with which it forms a complex. For example, the approximate order of selectivity for cations in (i) nitrate or chloride solutions was: $Cu^{2+} \gg Pb^{2+} > Fe^{3+} > Al^{3+} > Cr^{3+} > Ni^{2+} > Zn^{2+} > Ag^{+} > Co^{2+} > Cd^{2+} > Cd^{2$ $Fe^{2+} > Mn^{2+} > Ba^{2+} > Ca^{2+} \gg Na^+$; (ii) an acetate buffer system at pH 5: $Cu^{2+} \gg Fe^{2+} > Ni^{2+} > Pb^{2+} > Mn^{2+} \gg Ca^{2+} = Mg^{2+} \gg$ Na⁺; (iii) aqueous solutions at pH 4: $Hg^{2+} > Cu^{2+} > Pb^{2+} \gg$ $Ni^{2+} > Zn^{2+} > Cd^{2+} > Co^{2+} > Fe^{2+} > Mn^{2+} > Ca^{2+} \gg Na^+$; and (iv) the presence of 1.5 M $(NH_4)_2SO_4$ рH at ٩· $Co^{2+} > Ni^{2+} > Cd^{2+} > Cu^{2+} > Zn^{2+} > Ca^{2+} \gg Na^+$. These examples provided evidence of heterogeneities in the affinity for different ions depending on solutions [61,62]. In the present work, Chelex-100 resin was used in a complex matrix (digestive solution) and the mass of Zn accumulated in the binding phase at any deployment time was higher than those of Cd and Pb (Fig. 2). Zinc appears higher in the selectivity series than Cd and Pb $(Zn^{2+} \gg Cd^{2+} = Pb^{2+})$. Indeed, the uptake of Cd and Pb decreased after 6 h, caused by the lower selectivity of these elements. By contrast, Zn bound particularly strongly to Chelex-100 resin.

The TE concentrations measured by DGT were plotted against the total TE concentrations measured in the deployment solution (Fig. 3). Significant correlations were recorded for Cd (R^2 = 0.99), Pb (R^2 = 0.97), and Zn (R^2 = 0.99). In the digestive solution, 68.4%, 3.8%, and 39.8% of total Cd, Pb, and Zn, respectively, were measurable by the DGT devices.

For each experiment, total TE concentrations were fractionated in particulate (>0.22 μ m) and total dissolved (<0.22 μ m) metals. The mean distributions (for the four experiments) of Cd, Pb, and Zn between the particulate, dissolved, and labile fractions are displayed in Fig. 4. The results show that: (i) Cd and Zn were mainly present as dissolved fraction, (ii) the partitioning of Pb was quite similar between particulate and dissolved fractions, and (iii) the dissolved fraction was composed of 72%, 7.3%, and 43% of labile Cd, Pb, and Zn species, respectively. Compared to total dissolved TE concentrations, Cd complexes were mostly DGT-labile, whereas Pb complexes appeared mostly DGT-inert; the case of Zn complexes was intermediate. The Pb complexation with digestive juice ligands appears stronger than for Cd and Zn. Part of the ligands responsible for Cd, Pb, and Zn complexation were probably different. As a consequence, the chemical speciation profiles for Cd, Pb, and Zn were determined in digestive fluids by the JESS program.

The first simulations were carried out on gastrointestinal juices (Table 2) spiked with TEs together at various concentrations. The speciation was calculated at pH \sim 6.0. The simulations were conducted at a temperature of 37 °C and the ionic strength was calculated by JESS at equilibrium. Chemical speciation results were expressed as percentages of the total dissolved concentrations

(<0.22 µm) of TEs measured in the gastrointestinal fluid. Cadmium occurred predominantly as $CdClSO_4^-$ (77%), with other minor species such as CdCl₂SO₄²⁻ (13%), CdCl⁺ (4%), CdHCO₃⁺ (2%), CdCl₂ (2%), and Cd²⁺ (1%). The high sulphate and chloride concentrations in the digestive juice explained the presence of CdClSO₄species. However, further work is needed to determine if this species could exist under in vivo conditions. Compared to the results given by DGT, the results predicted by JESS (in the analytical conditions) showed that cadmium sulphate-chloride complexes were mostly DGT-labile. Lead was predicted to occur as an array of phosphate species, $PbH_4(PO_4)_4^{6-}$ (92%) and $PbH_3(PO_4)_3^{4-}$ (2%), with other minor carbonate species accounting for the remainder (PbHCO₃⁺ (3%), PbH₂(CO₃)₂ (2%), and PbCO₃ (1%)). Previous studies [63] showed that important lead fractions in the chyme were lead phosphate complexes but also lead bile complexes. As reported by Oomen et al. [63], lead bile complexes appear to represent complexes able to solubilize, whereas lead phosphate complexes are thermodynamically stable and appear as insoluble salts. In the present study, bile salts were not included in the JESS program due to insufficient information on these components. The absence of bile salts in the model could potentially influence the predicted speciation and slightly overestimate the fraction of lead phosphate complexes. However, the results given by DGT are in agreement with those predicted by JESS. Lead complexes appeared mostly DGT-inert (93%) and Pb was predicted to exist mainly as phosphate species (94%). The study of the chemical speciation of Zn in the human digestive fluid predicted that the element appeared to exist as Zn^{2+} (37%), zinc carbonate [Zn(OH)(CO₃)⁻ (26%) and ZnHCO₃⁺ (10%)], ZnCl⁺ (6%), and formed negatively charged complexes with phosphate, namely $ZnH(PO_4)_2^{3-}$ (10%) and $ZnH_2(PO_4)_2^{2-}$ (10%). Compared to the results given by DGT, where 43% of total Zn were



Fig. 4. Mean distribution of total Cd, Pb, and Zn between the particulate, dissolved and labile fractions for the four experiments where digestive juices were spiked with Cd, Pb, and Zn.



Fig. 5. Mass of TE accumulated on resins at various immersion times of three DGT replicate devices (at 25 °C) in the artificial gastrointestinal juices after the UBM test on soil sample S0.

measurable, the results predicted by JESS showed that zinc complexes were mostly DGT-inert in these analytical conditions.

3.1.2. DGT performance in digestive juices after the UBM test

The validity of metal sampling using DGT was investigated in gastrointestinal fluids (at 25 °C) after carrying out the UBM test on one soil sample (S0; Fig. 5). Taking into consideration the last results on the validation in spiked gastrointestinal fluids, the DGT device deployment in the digestive fluids (for S0) was limited to 6 h. The time series test showed that the accumulated mass of TE on DGT resins was linear for Cd, Pb, and Zn with respect to deployment time (Fig. 5).

The experiment indicated that 36%, 2.3%, and 15% of total Cd, Pb, and Zn, respectively, in the solution were measurable by the DGT devices. Compared to the previous experiment with spiked digestive solutions, these results showed that the introduction of contaminated soil altered the lability of Cd and Zn. Cadmium and Zn concentrations measured by DGT decreased strongly, whereas Pb concentrations decreased slightly, which could indicate the presence of more stable metal complexes with soil components that are not labile regarding the DGT technique.

The mean distributions of Cd, Pb, and Zn between particulate, dissolved, and labile fractions are displayed in Fig. 6. These results showed that (i) the partitioning of Cd and Zn was quite similar between the particulate and dissolved fractions, (ii) Pb was mainly present as particles, and (iii) the dissolved fraction was composed of 63%, 15%, and 33% of labile Cd, Pb, and Zn species, respectively. Compared to the previous experiments with spiked digestive juices, the introduction of contaminated soil provided evidence for (i) a sub-



Fig. 6. Mean distribution of total Cd, Pb, and Zn between the particulate, dissolved, and labile fractions of sample S0.

stantial increase of TEs as particles, which explains the decrease of TE concentrations measurable by the DGT devices, but (ii) few changes in the percentage of labile species. The percentage of labile Cd and Zn slightly decreased, whereas the percentage of labile Pb slightly increased from the experiment without soil to the experiments with the soil sample. On the whole, cadmium complexes were mostly DGT-labile, whereas lead complexes appeared mostly DGT-inert; the zinc complexes were intermediate.

Another JESS simulation was carried out on gastrointestinal juices after the UBM test on the S0 soil sample. In these conditions, the pH value was approximately 6.3. In addition to total concentrations of the gastrointestinal juice components, some compounds provided by the soil samples were included in the simulation such as iron $(3.35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}, \text{ Table 2})$ and manganese $(3.04 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}, \text{ Table 2})$ contents. The introduction of these elements in the simulation provided evidence that there was no significant change in Cd and Pb speciation, and a different distribution for Zn. In these conditions, free Zn decreased (~15% of the total dissolved Zn concentration) and zinc carbonate and phosphate complexes increased (~55% and ~30%, respectively). These results seem to be more closely related to the increase of pH value than to the introduction of Fe and Mn.

To complete the validity of metal sampling using DGT in gastrointestinal fluids, another experiment on sample SO was conducted at 37 °C. The effect of temperature on the diffusion of ions in the gel was investigated because gel properties such as structure and dimension may be altered by temperature and consequently affect the diffusion process. Diffusion is a process of mass transport across a concentration gradient. The rate of such mass transport depends not only on the concentration gradient, but also on the temperature through the variation of diffusion coefficient (D) with temperature. The results showed that the measured TE concentrations in the eluates were linear for Cd ($R^2 = 0.99$), Pb ($R^2 = 0.95$), and Zn ($R^2 = 0.95$) with respect to deployment time (<6 h). This suggests that the structure and dimension of the gel are stable within the temperature tested. Fig. 7 presents the labile TE concentrations (C_{DCT}) measured at 25 °C and 37 °C in the artificial gastrointestinal fluids after carrying out the UBM test on the SO soil sample.

The results provided evidence of a substantial effect of temperature on the diffusion of ions in the gel and on C_{DGT} : on an average, (i) a 38% decrease in labile Cd concentrations, (ii) a 57% decrease in labile Pb concentrations, and (iii) a 44% decrease in labile Zn concentrations, when temperature was raised from 25 to 37 °C. As previously, a JESS simulation was carried out at 37 °C. At this temperature, the pH value rose and was about 6.6. In these conditions, Cd and Pb speciations were found to be quite similar, whereas zinc carbonate increased strongly (~97% of total dissolved Zn concentration). The large differences observed between TE concentrations measured by DGT at 25 and 37 °C could be mainly due to the consid-



Fig. 7. Labile metal concentrations (C_{DGT}) measured at 25 °C and 37 °C in the artificial gastrointestinal juices after the UBM test on the S0 soil. The mean values and standard deviations of three replicate devices are given (results expressed as a percentage of the total concentrations in the gastrointestinal fluid).

erable increase of the particulate fraction in the digestive solutions when the temperature was raised.

Overall, the validity of labile Cd, Pb, and Zn measurement using DGT in gastrointestinal fluids was checked. However, the shorter duration for Cd and Pb (<6 h) prevented significant changes in the sample.

3.2. DGT as a speciation tool in digestive juices

3.2.1. In vitro oral bioaccessibility of Cd, Pb, and Zn

In the present study, transport of bioaccessible TE across the intestinal epithelium was investigated using the DGT technique. For that purpose, the UBM test was carried out on six soils (coded S1–S6; Table 1) with a high variability in terms of physicochemical parameters. Regarding the major pollutants (Cd, Pb, and Zn), the lowest and highest total concentrations were as follows: 5.5 and 30.2 mg kg^{-1} for Cd, 269 and 3711 mg kg^{-1} for Pb, and 405 and 5830 mg kg⁻¹ for Zn. The results of the UBM test for bioaccessibility of Cd, Pb, and Zn in soils (S1-S6) are shown in Table 3. The concentrations extracted from soils within the simulated gastrointestinal phase ranged from 1.7 to 9.9 mg kg⁻¹ for Cd, 76 to 1384 mg kg⁻¹ for Pb, and 13 to 1311 mg kg⁻¹ for Zn. Bioaccessible Cd, Pb, and Zn (expressed as a percentage of the total concentrations in the soils) did not show large variation among the samples and were, on average, $31 \pm 5\%$, $28 \pm 7\%$, and $17 \pm 8\%$, respectively (Table 3). For all samples, TE bioaccessibility in the gastrointestinal phase was relatively low. In near-neutral pH and the carbonate-rich environment of the gastrointestinal phase, TE may be stabilized in solution by processes of complexation, readsorption on remaining soil particles or other indigestible materials present in chyme, and/or precipitation as relatively insoluble compounds [10,64]. As a consequence, soil physicochemical parameters and TE mineralogy could greatly influence metal uptake. The intestinal compartment is a complex environment where mechanisms of absorption, precipitation, and interaction with enzymatic compounds, including the high metabolic activity of bacteria, are not easily simulated [65]. As suggested by Marschner et al. [66], the concentration of soluble TE in the intestinal phase is a function of the availability of ligands.

3.2.2. Lability of TE complexes assessed by DGT

The DGT devices were deployed in the gastrointestinal fluids (pH 6.3 ± 0.5) after the UBM test was carried out on soils S1–S6 (Table 3). In the solutions, TEs exist as inorganic species and as organic complexes that can dissociate quickly (labile) or slowly (inert). DGT

	S1		S2		S3		S4		S5		SG	
	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	%	$mg kg^{-1}$	%	mg kg ⁻¹	%
Cd												
Total	22.9	I	30.2	I	28.4		18.1	I	5.5	I	13.0	I
Gastrointestinal	5.3 ± 0.1	23.3 ± 0.4	9.9 ± 0.1	32.7 ± 0.2	7.5 ± 0.2	26.5 ± 0.6	6.8 ± 0.1	37.5 ± 0.6	1.7 ± 0.1	31.4 ± 1.1	3.9 ± 0.1	30.3 ± 1.1
DGT open-pore	1.8 ± 0.3	7.9 ± 1.4	3.2 ± 0.6	10.7 ± 2.0	2.9 ± 0.5	10.2 ± 1.9	4.3 ± 0.8	23.8 ± 4.4	1.7 ± 0.3	30.4 ± 5.6	2.9 ± 0.5	22.4 ± 4.1
DGT rest	1.5 ± 0.3	6.5 ± 1.1	2.7 ± 0.5	9.0 ± 1.6	2.3 ± 0.4	8.2 ± 1.5	3.7 ± 0.7	20.7 ± 3.6	1.6 ± 0.3	28.9 ± 5.1	2.5 ± 0.4	18.9 ± 3.4
dq												
Total	536	I	3711	I	2497	I	306	I	269	I	824	I
Gastrointestinal	155 ± 3	28.9 ± 0.5	1384 ± 38	37.3 ± 1.0	674 ± 16	26.9 ± 0.6	94 ± 9	30.6 ± 3.1	76 ± 21	28.1 ± 7.8	120 ± 5	14.5 ± 0.6
DGT open-pore	19 ± 4	3.5 ± 0.7	22 ± 4	0.6 ± 0.1	19 ± 4	0.8 ± 0.1	33 ± 6	10.7 ± 2.0	30 ± 6	11.1 ± 2.0	37 ± 7	4.5 ± 0.8
DGT rest	22 ± 5	4.1 ± 0.9	24 ± 4	0.6 ± 0.1	23 ± 5	0.9 ± 0.2	33 ± 7	10.8 ± 2.2	28 ± 5	10.4 ± 1.8	36 ± 7	4.3 ± 0.9
Zn												
Total	3040	I	5830	I	1813	I	2167	I	405	I	1060	I
Gastrointestinal	743 ± 20	24.4 ± 0.6	1311 ± 24	22.5 ± 0.4	334 ± 12	18.4 ± 0.6	521 ± 55	24.0 ± 2.5	13 ± 1	3.2 ± 0.2	113 ± 1	10.6 ± 0.1
DGT open-pore	213 ± 39	7.0 ± 1.3	126 ± 23	2.2 ± 0.4	74 ± 14	$4.0 \pm 0.$	98 ± 18	4.5 ± 0.8	3 ± 1	0.8 ± 0.1	36 ± 7	3.4 ± 0.6
DGT rest	177 ± 31	5.8 ± 1.0	108 ± 20	1.8 ± 0.3	55 ± 10	3.0 ± 0.6	79 ± 16	3.6 ± 0.7	3 ± 1	0.6 ± 0.1	23 ± 4	$2.2. \pm 0.4$
Mean values and stand.	ard deviations of	three replicates at	re given (mg kg ⁻¹	and % of total con	centrations in so	il samples).						

Table :



Fig. 8. Mean distribution of total Cd, Pb, and Zn between the particulate, dissolved, and labile fractions of soils S1–S6.

measures all the inorganic species and the labile organic species with molecular sizes sufficiently smaller than the pore size of the diffusive gel to allow them to diffuse freely through it, as well as a fraction of larger molecule, which will be partly impeded [24]. Using different types of gel for the diffusive layer, the inorganic species in solution can be measured separately from the organic species [26]. In the present study, deployment of twin DGT devices with different gel layers (open-pore and restricted gels) was carried out to provide a measurement of both labile inorganic (restricted gel) and total labile species (open-pore gel) (Table 3). For all the soils studied, no significant difference (ANOVA, Tukey test, p < 0.05) was observed between TE concentrations measured by DGT with openpore and restricted gels, which indicates that in the experimental conditions (deployment time of 3 h), mainly labile inorganic species present in the gastrointestinal fluids were able to diffuse across the diffusive gel. As a consequence, only the results with the open-pore device were taken as the estimation of TE concentrations measured by DGT.

The bioaccessibility of TE provided a measure of their solubility in the gastrointestinal tract while the bioavailability is defined as the fraction of ingested metal that is absorbed into systemic circulation. This fraction will be less than the bioaccessible fraction, due to incomplete TE uptake in the small intestine. Only a fraction of bioaccessible compounds can be transported across the intestinal epithelium. The present study's goal was to investigate the DGT technique as a tool to extrapolate this fraction. The TE concentrations measured by DGT (expressed as a percentage of bioaccessible concentration in the gastrointestinal phase) ranged from 33 to 97% for Cd, 2 to 40% for Pb, and 10 to 32% for Zn and showed significant variations among the six soils studied, which could be explained by the high variability in terms of soil physicochemical parameters.

The mean distributions of Cd, Pb, and Zn between particulate, dissolved, and labile fractions are displayed in Fig. 8 for the six experimental soils. These results provide evidence for significant variations between particulate and dissolved fractions for the various soils. However, Pb was mainly present as particles. For all soils, the dissolved fraction was composed of 10-87%, 6-46%, and 1-15% of labile Cd, Pb, and Zn species, respectively. JESS was used to model gastrointestinal juices after the UBM test on soils S1–S6. In these conditions, pH values were 6.8 ± 0.1 . In addition to total concentrations of the gastrointestinal juice components, total dissolved TE concentrations and iron plus manganese contents (Table 2) were included in the simulation. For all six soils, the results provided evidence for no significant change for Cd, Pb, and Zn speciation. In these conditions: (i) Cd occurred predominantly as CdClSO₄⁻ (75.8 \pm 0.4%), with other minor species such as $CdCl_2SO_4^{2-}$ (12.8 ± 0.4%), $CdCl^+$ (5.0 ± 0.1%), $CdHCO_3^+$ (4.0 ± 0.1%), and $CdCl_2$ (2.0 \pm 0.1%); (ii) lead was predicted to occur as an array of phosphate species, $PbH_4(PO_4)_4^{6-}$ (97.8 ± 0.4%) and $PbH_3(PO_4)_3^{4-}$ $(1.0\pm0.1\%)$, with other minor carbonate species accounting for the remainder (PbCO₃, $1.0 \pm 0.1\%$); (iii) the study of the chemical speciation of Zn in the human digestive fluid predicted that the

element formed mainly as negatively charged complexes with carbonate, namely $Zn(OH)(CO_3)^-$ (97.8 ± 0.4%), and appeared to exist as zinc phosphate ($ZnH(PO_4)_2^{3-}$, 1.5 ± 0.5%) and Zn^{2+} (1.2 ± 0.4%). The labile TE fractions varied from S1 to S6, whereas TE speciation delivered no significant change, which indicates that TE concentrations measured by DGT were highly variable and affected by the physicochemical parameters of the soils. The presence of particulate fractions in the digestive solutions could alter the TE speciation and explain the lability differences observed between the six soils. In this study, the introduction of these fractions into the JESS simulation was not taken into account and requires further investigation.

3.2.3. DGT as a speciation tool for the assessment of bioavailable TE

The permeability characteristics of the epithelial layer correspond to a molecular weight of 19,400 Da and a molecular radius of 3.1 nm [67]. Considering these human intestine characteristics, the usage of DGT diffusive open-pore gel, with a molecule size range of about 2–9 nm in diameter [28], could most probably approach *in vivo* conditions. For all six soils, the gastrointestinal absorption of ingested TEs, simulated using the DGT technique, ranged from 8 to 30% for Cd, 0.6 to 11% for Pb, and 0.8 to 7% for Zn (Table 3). The data obtained were therefore compared to data determined by other models used to simulate the intestinal membrane.

For Cd exposure through ingestion, very few studies have been conducted on human health risk. These experiments showed that gastrointestinal absorption of ingested Cd ranged from 5 to 20% and was influenced by Cd speciation [20,68,69]. Other studies [20,69] showed that Cd^{2+} was not the only species that was transported into cells and that more than the free fraction should be considered as available for transport across the intestinal epithelium. In the present study, Cd absorption from soils S1–S6 also appeared to be variable (8–30%) and seems to be affected by the form in which Cd is present in the gastrointestinal fluid. The JESS simulation provided evidence for Cd complexes, mainly sulphate–chloride complexes (CdClSO₄⁻), which were mostly DGT-labile.

Several studies were conducted to estimate the absorption and bioavailability of Pb solubilized from soil by *in vitro* tests. The U.S. Environmental Protection Agency has based its definition of hazardous Pb levels in playground soils (400 mg kg^{-1}) and residential garden soils (1200 mg kg^{-1}) on the assumption that 30% of ingested soil Pb is bioavailable [70]. However, other studies suggested that Pb bioavailability may be dependent on the form and solubility of Pb present and site-specific soil chemistry [66,71]. The consideration of a default 30% bioavailability value may not be appropriate for all types of Pb contamination. Marschner et al. [66] showed that only very small amounts of Pb administered to pigs were actually absorbed in the gastrointestinal tract (between 0.5 and 1.9% of the total Pb dose for the soils). In the same way, an isotope study with human adults has shown that 26% of Pb, in fasting conditions, was absorbed from a contaminated soil, while the uptake was only 2.5% in fed conditions [72]. In vivo studies showed that Pb absorption was moderate and ranged from 35 to 70% for fasting adults and from 2 to 25% for soluble lead salts taken with meals [15]. Lead absorption from a soil matrix appeared to be highly variable and is affected by the form in which Pb is added [73–76]. Oomen et al. [15] showed that lead phosphate and lead bile complexes were important Pb forms in chyme, and the free Pb²⁺ fraction was negligible. Even if lead phosphate complexes are thermodynamically stable and appear as insoluble salts, it was shown that these complexes were slightly soluble and labile within a voltammetric time scale and they could be considered candidates for dissociation and subsequent transport across the intestinal membrane [63]. In the present study, Pb absorption from soils S1-S6 ranged from 0.6 to 11% (Table 3). The JESS simulation predicted that Pb occurred mainly as phosphate complexes (99%) with other minor carbonate species (1%). No free Pb^{2+} was detectable. As a consequence, the Pb fraction measured by DGT (i.e., 0.6-11% of complexed forms) could contribute to metal transport across the intestinal epithelium. Possibly, some of these complexes (in particular phosphate complexes) can thus release a small amount of free Pb²⁺ during the diffusion through the DGT devices. Low Pb concentrations measured by DGT provided evidence for a low absorption of Pb. As reported by Oomen et al. [63], a great majority of lead phosphate complexes could be present as macroscopic particles unable to dissociate in the experimental conditions and thus not available for transport across the intestinal epithelium. Only microscopic lead phosphate complexes could dissociate.

Very few studies have looked at Zn bioaccessibility, and the human health risk of Zn exposure through ingestion is poorly documented. Zinc is an essential trace element in the human body, which regulates uptake of excess Zn. However, in conditions of acute or chronic ingestion of high doses, Zn toxicity may bring about inhibition of iron and copper absorption and copper deficiency [77]. The Zn bioaccessible and labile values constitute a first approach when estimating human exposure. Although Zn absorption and endogenous excretion cannot be measured directly in animals, some studies [78] showed that absorption of dietary Zn was about 20–40%, mainly as a complex in small intestine. Only free Zn ions seem to be biologically active [78]. In the present study, Zn absorption from soils S1-S6 was estimated at approximately 0.8-7% (Table 3). Zinc was predicted to form mainly negatively charged complexes with carbonate and occurred little as Zn²⁺, in agreement with the observed low absorption of Zn.

4. Conclusions

The DGT technique is a simple, effective and reliable tool for the investigation of TE speciation in digestive fluids. The TE accumulation linearity and the accumulation stability were checked up to 6 h in gastrointestinal fluids at 37 °C. The in vitro UBM test combined with the DGT technique and the JESS program allowed us to investigate the TE species available for transport across the intestinal epithelium, but extrapolation to the in vivo situation should be considered with great caution. The main conclusions obtained on the six soils highly affected by the past atmospheric emissions of two smelters were that: (i) the labile species present in the gastrointestinal fluids were mainly inorganic species, (ii) the JESS simulation provided evidence that TE complexes were mainly sulphate-chloride complexes for Cd, phosphate complexes for Pb, and carbonate complexes for Zn, and (iii) the gastrointestinal absorption of ingested TEs ranged from 8 to 30% for Cd, 0.6 to 11% for Pb, and 0.8 to 7% for Zn. The experimental data obtained on Cd, Pb, and Zn concentrations measured by DGT (i.e., TE bioavailability) were in agreement with data determined by other models used to simulate the intestinal membrane. The results suggest that Cd, Pb,

and Zn bioavailability was dependent on the form and solubility of TEs present and site-specific soil chemistry. These results highlighted the need for a better understanding of the mechanisms by which TEs are absorbed from the human gastrointestinal tract, and for caution in the interpretation of computer simulations of chemical speciation. The introduction of solids into the JESS simulation was not taken into account. Their presence could alter the TE speciation and requires further investigation. Evaluation of DGT as a metal speciation tool in human digestive fluids is novel and opens a wide field of practical research.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Nord-Pas de Calais Council and ADEME for the financial support of this research.

Appendix A. Standards

NF ISO 11464. Soil quality – Pretreatment of samples for physicochemical analyses. AFNOR, 1994, 9 pp.

NF X 31-107. Soil quality – Particle size determination by sedimentation – Pipette method. AFNOR, 1983, 15 pp.

NF ISO 10390. Soil quality – Determination of pH. AFNOR, 1994, 5 pp.

NF ISO 10694. Soil quality – Determination of organic and total carbon after dry combustion (elementary analysis). AFNOR, 1995, 7 pp.

NF ISO 10693. Soil quality – Determination of carbonate content – volumetric method. AFNOR, 1995, 7 pp.

NF X 31-147. Soil quality – Soils, sediments – total solubilizing by acid attack. AFNOR, 1996, 12 pp.

References

- J.P. Day, J.E. Fergusson, T.M. Chee, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 23 (1979) 497–502.
- [2] M.J. Duggan, M.J. Inskip, S.A. Rundle, J.S. Moorcroft, Sci. Total Environ. 44 (1985) 65–79.
- [3] B.G. Wixson, B.E. Davies, Environ. Sci. Technol. 28 (1994) 26-31.
- [4] A.G. Oomen, A. Hack, M. Minekus, E. Zeijdner, G. Schoeters, W. Verstraete, T.V.D. Wiele, J. Wragg, C.J.M. Rompelberg, A.J.A.M. Sips, J.H.V. Wijnen, Environ. Sci. Technol. 36 (2002) 3326–3334.
- [5] M.V. Ruby, R. Schoof, W. Brattin, M. Goldade, G. Post, M. Harnois, D.E. Mosby, S.W. Casteel, W. Berti, M. Carpentier, D. Edwards, D. Cragin, W. Chappell, Environ. Sci. Technol. 33 (1999) 3697–3705.
- [6] K.M. Ellickson, R.J. Meeker, M.A. Gallo, B.T. Buckley, P.J. Lioy, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 40 (2001) 128–135.
- [7] M.V. Ruby, A. Davis, T.E. Link, R. Schoof, R.L. Chaney, G.B. Freeman, P. Bergstrom, Environ. Sci. Technol. 26 (1993) 1242–1248.
- [8] S.C. Hamel, K.M. Ellickson, P.J. Lioy, Sci. Total Environ. 244 (1999) 273-283.
- [9] R.R. Rodriguez, N.T. Basta, Environ. Sci. Technol. 33 (1999) 642-649.
- [10] N. Basta, R. Gradwohl, J. Soil Contam. 9 (2000) 149–164.
- [11] D.J. Paustenbach, J. Toxicol. Environ. Health B 3 (2000) 179–291.
- [12] J.R. Dean, R. Ma, Chemosphere 68 (2007) 1399-1407.
- [13] P.G.C. Campbell, in: A. Tessier, D.R. Turner (Eds.), Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems, IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems, Wiley, Chichester, 1995, pp. 45–102.
- [14] H.P. Van Leeuwen, Environ. Sci. Technol. 33 (1999) 3743-3748.
- [15] A.G. Oomen, J. Tolls, A.J.A.M. Sips, J.P. Groten, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 44 (2003) 116–124.
- [16] D. Chan, W. Black, B.A. Hale, J. Environ. Sci. Health A 42 (2007) 1283-1291.
- [17] L.H. Shen, J. Luten, H. Robberecht, J. Bindels, H. Deelstra, Z. Lebensm, Unters. Forsch. 199 (1994) 441–445.
 [18] P. Huang, Z.L. Tap, T.Y. Ying, Y.F. Dan, T.L. Leo, Anim. Food Sci. Technol. 88 (2000).
- [18] R.I. Huang, Z.L. Tan, T.X. Xing, Y.F. Pan, T.J. Lee, Anim. Feed Sci. Technol. 88 (2000) 79–89.
- [19] D. Bosscher, Z. Lu, G. Janssens, M. Van Caillie-Bertrand, H. Robberecht, H. De Rycke, R. De Wilde, H. Deelstra, Br. J. Nutr. 86 (2001) 241–247.
- [20] W. Davison, H. Zhang, Nature 367 (1994) 546-548.
 [21] W. Davison, P. Hooda, H. Zhang, A.C. Edwards, Adv. Environ. Res. 3 (2000) 550-555.
- [22] H. Zhang, W. Davison, Anal. Chem. 72 (2000) 4447-4457.
- [23] H. Zhang, F.J. Zhao, B. Sun, W. Davison, S.P. McGrath, Environ. Sci. Technol. 35 (2001) 2602–2607.
- [24] H. Zhang, W. Davison, Anal. Chim. Acta 398 (1999) 329-340.

- [25] M.H. Tusseau-Vuillemin, R. Gilbin, M. Taillefert, Environ. Sci. Technol. 37 (2003) 1645–1652.
- [26] H. Zhang, W. Davison, S. Miller, W. Tych, Geochim. Cosmochim. Acta 59 (1995) 4181–4192.
- [27] S. Denney, J. Sherwood, J. Leydon, Sci. Total Environ. 239 (1999) 71-80.
- [28] M.C. Alfaro-De la Torre, P.Y. Beaulieu, A. Tessier, Anal. Chim. Acta 418 (2000) 53-68.
- [29] M.R. Twiss, J.W. Moffett, Environ. Sci. Technol. 36 (2002) 1061-1068.
- [30] S. Scally, W. Davison, H. Zhang, Anal. Chim. Acta 558 (2006) 222-229.
- [31] H. Zhang, W. Davison, B. Knight, S. McGrath, Environ. Sci. Technol. 32 (1998) 704-710.
- [32] H. Zhang, W. Davison, A.M. Tye, N.J.M. Crout, S.D. Young, Environ. Toxicol. Chem. 25 (2006) 664–670.
- [33] M.L. Ruello, M. Sileno, D. Sani, G. Fava, Chemosphere 70 (2008) 1135-1140.
- [34] H. Zhang, W. Davison, Anal. Chem. 67 (1995) 3391–3400.
 [35] M.P. Harper, W. Davison, H. Zhang, W. Tych, Geochim. Cosmochim. Acta 62
- (1998) 2757–2770. [36] M.P. Harper, W. Davison, W. Tych, Environ. Model. Softw. 15 (2000) 55–66.
- [37] J.L. Roulier, M.H. Tusseau-Vuillemin, M. Coquery, O. Geffard, J. Garric, Chemosphere 70 (2008) 925–932.
- [38] R. Buzier, M.H. Tusseau-Vuillemin, J.M. Mouchel, Sci. Total Environ. 358 (2006) 277–285.
- [39] R. Buzier, M.H. Tusseau-Vuillemin, M. Keirsbulck, J.M. Mouchel, Phys. Chem. Earth (2008), doi:10.1016/j.pce.2008.09.003.
- [40] T. Yapici, I.I. Fasfous, J. Murimboh, C.L. Chakrabarti, Anal. Chim. Acta 622 (2008) 70–76.
- [41] E. Tipping, Comput. Geosci. 20 (1994) 973-1023.
- [42] M.F. Benedetti, C.J. Milne, D.G. Kinniburgh, W.H. Van Riemsdijk, L.K. Koopal, Environ. Sci. Technol. 29 (1995) 446–457.
- [43] D.G. Kinniburgh, W.H. Van Riemsdijk, L.K. Koopal, M. Borkovec, M.F. Benedetti, M.J. Avena, Colloids Surf. A 151 (1999) 147–166.
- [44] J.P. Gustafsson, J. Colloids Interface Sci. 244 (2001) 102–112.
- [45] P.M. May, K. Murray, Talanta 38 (1991) 1409-1417.
- [46] P.M. May, K. Murray, Talanta 38 (1991) 1419-1426.
- [47] P.M. May, K. Murray, Talanta 40 (1993) 819-825.
- [48] L.M. Webb, D.M. Taylor, D.R. Williams, J. Alloys Compd. 271-273 (1998) 112-115.
- [49] P.W. Jones, D.M. Taylor, L.M. Webb, D.R. Williams, Appl. Radiat. Isotopes 57 (2002) 159-165.
- [50] T. Sterckeman, F. Douay, N. Proix, H. Fourrier, E. Perdrix, Water Air Soil Pollut. 135 (2002) 173–194.
- [51] F. Douay, C. Pruvot, H. Roussel, H. Ciesielski, H. Fourrier, N. Proix, C. Waterlot, Water Air Soil Pollut. 188 (2008) 247–260.
- [52] F. Douay, C. Pruvot, C. Waterlot, C. Fritsch, H. Fourrier, A. Loriette, G. Bidar, C. Grand, A. de Vaufleury, R. Scheifler, Sci. Total Environ. 407 (2009) 5564–5577.
- [53] C. Pruvot, F. Douay, H. Fourrier, C. Waterlot, J. Soil Sediments 6 (2006) 215-220.
- [54] M. Cave, J. Wragg, B. Klinck, C. Grøn, T. Oomen, T.V.D. Wiele, I. Ollson, K. Koch,

N. Reimer, N. Basta, K. Tack, S. Casteel, Preliminary assessment of a unified bioaccessibility method for arsenic in soils, in: International Conference in Epidemiology and Environmental Exposure, Paris, 2006.

- [55] H. Roussel, C. Waterlot, A. Pelfrêne, C. Pruvot, M. Mazzuca, F. Douay, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 58 (2010) 945–954.
- [56] A. Pelfrêne, C. Waterlot, M. Mazzuca, C. Nisse, G. Bidar, F. Douay, Environ. Geochem. Health. doi:10.1007/s10653-010-9365-z.
- [57] J. Caboche, Validation d'un test de measure de bioaccessibilité Application à 4 éléments traces métalliques dans les sols: As, Cd, Pb et Sb, Ph.D. thesis, Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, 2009.
- [58] E. Merian, M. Anke, M. Ihnat, M. Stoeppler, Elements and their Compound in the Environment Metals and their Compounds, vol. 2, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2004.
- [59] G.M. Pierzynsky, J.T. Sims, G.F. Vance, Soils and Environmental Quality, CRC Press/Taylor & Francis, New York, 2007.
- [60] C. Karadas, D. Kara, Environ. Sci. Pollut. Res. doi:10.1007/s11356-010-0404-1.
- [61] P. Figura, B. McDuffie, Anal. Chem. 49 (1977) 1950-1953.
- [62] R.E. Van Grieken, C.M. Bresseleers, B.M. Vanderborght, Anal. Chem. 49 (1977) 1326-1331.
- [63] A.G. Oomen, J. Tolls, A.J.A.M. Sips, M.A.G.T. Van den Hoop, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 44 (2003) 107–115.
- [64] C. Grøn, L. Andersen, Human bioaccessibility of heavy metals and PAH from soil: environmental project no. 840, Technology Programme for Soil and Groundwater Contamination, Danish Environmental Protection Agency, 2003.
- [65] J.L. Schroder, N.T. Basta, S.W. Casteel, T.J. Evans, M.E. Payton, J. Si, J. Environ. Qual. 33 (2004) 513–521.
- [66] B. Marschner, P. Welge, A. Hack, J. Wittsiepe, M. Wilhelm, Environ. Sci. Technol. 40 (2006) 2812–2818.
- [67] E. Duizer, A.H. Penninks, W.H. Stenhuis, J.P. Groten, J. Control Release 49 (1997) 39–49.
- [68] P.G. Reeves, R.L. Chaney, Environ. Res. 96 (2004) 311-322.
- [69] C. Jumarie, P.G.C. Campbell, A. Berteloot, M. Houde, F. Denizeau, J. Membr. Biol. 158 (1997) 31–48.
- [70] U.S. EPA, Fed. Regist. 66 (2001) 1206-1240.
- [71] M.V. Ruby, A. Davis, R. Schoof, S. Eberle, C.M. Sellstone, Environ. Sci. Technol. 30 (1996) 422–430.
- [72] M. Maddaloni, N. Lolacono, W. Manton, C. Blum, J. Drexler, J. Graciano, Environ. Health Perspect. 106 (1998) 1589–1594.
- [73] D. Barltrop, F. Meek, Postgrad. Med. J. 51 (1975) 805-809.
- [74] M.B. Rabinowitz, J.D. Kopple, G.W. Wetherill, Am. J. Clin. Nutr. 33 (1980) 1784–1788.
- [75] M.P. Dieter, H.B. Matthews, R.A. Jeffcoat, R.F. Moseman, J. Toxicol. Environ. Health 39 (1993) 79–93.
- [76] G.B. Freeman, J.A. Dill, J.D. Johnson, P.J. Kurtz, F. Parham, H.B. Matthews, Fundam. Appl. Toxicol. 33 (1996) 109–119.
- [77] A.B. Abdel-Mageed, F.W. Oeheme, Vet. Hum. Toxicol. 32 (1990) 34-39.
- [78] H. Tapiero, K.D. Tew, Biomed. Pharmacother. 57 (2003) 399-411.

CHAPITRE II

Détermination de la bioaccessibilité des métaux dans différentes matrices

II.1. Le secteur d'étude

Des recherches réalisées depuis plus de 20 ans à proximité de sites métallurgiques du Nord-Pas de Calais ont mis en évidence une forte contamination en polluants métalliques des sols (des Ligneris et al., 1999; Douay et al., 2008a), laquelle dépasse très fortement les teneurs naturelles agricoles habituelles en région (Sterckeman et al., 2000, 2002). Plus spécifiquement, le LGCgE-ISA Lille mène, depuis 1994, des études sur un des secteurs de l'ancien Bassin Minier : le site atelier de Metaleurop qui fait partie du réseau « Sites Ateliers Français pour l'Innovation et la Recherche (SAFIR) » (<u>www.safir-network.com</u>). Ces travaux visent notamment à évaluer les effets de la contamination des sols sur l'environnement et la santé humaine. Aussi, c'est plus particulièrement sur ce secteur que s'inscrit l'ensemble de mes travaux de recherche réalisés au LGCgE-ISA Lille.

La contamination des sols observée sur le site atelier résulte de l'accumulation de poussières provenant des activités industrielles passées de deux usines de production de métaux non-ferreux implantées pendant plus d'une centaine d'années au cœur de l'ancien Bassin Minier entre Lens et Douai. La fonderie Nyrstar, anciennement appelée Umicore, située sur la commune d'Auby produit du zinc et la fonderie Metaleurop Nord de Noyelles-Godault produisait essentiellement, jusqu'à l'arrêt de ses activités en 2003, du plomb et du zinc. Les différents procédés thermiques utilisés par le passé ont engendré des émissions atmosphériques importantes de métaux, principalement Pb, Cd et Zn, qui se sont déposées sur les sols environnants (Luttringer et De Cormis, 1979 ; ENSTIMD, 1982 ; Godin, 1986 ; Sterckeman et al., 2000, 2002). Les rejets atmosphériques de Nyrstar sont maintenant très faibles en raison du remplacement, en 1975, du process pyrométallurgique par un procédé hydrométallurgique. Malgré des améliorations environnementales considérables, Metaleurop Nord a continué d'émettre dans l'atmosphère des rejets particulièrement importants. En 2002, les rejets canalisés émis par les cheminées étaient encore de 16,9 tonnes de Pb, 31,6 tonnes de Zn et 0,98 tonne de Cd (DRIRE, 2003). Malgré l'arrêt des émissions, la problématique liée à la forte contamination des sols par les polluants métalliques demeure, même si la pollution est aujourd'hui considérée comme historique. Le secteur concerné couvre une surface de l'ordre d'une centaine de km² et englobe des zones urbanisées (environ 55 000 habitants), des bois et de vastes surfaces agricoles.

Dans le cadre de la gestion des sols pollués, l'évaluation de l'impact des éléments métalliques sur la population est une question majeure. Plusieurs études ont été réalisées sur l'imprégnation à Pb et Cd de la population vivant sur le site atelier Metaleurop (Declercq et Beaubois, 2001 ; Leroyer et al., 2001 ; Declercq et Ladrière, 2005). Selon leur nature et leurs concentrations, ces métaux peuvent affecter la santé humaine et engendrer des effets hématologiques, osseux, neurologiques et rénaux, ainsi que des effets sur la reproduction (INRS, 1997, 1998 ; ATSDR, 1999, 2007 ; Pichard, 2003a, 2004).

De nombreuses études épidémiologiques tentent d'identifier les déterminants de l'imprégnation de la population au plomb. Leur exposition à cet élément se fait par des voies multiples (InVS, 2002) : (1) ingestion d'aliments contenant du plomb, (2) la déglutition, après portage main-bouche, de particules de sol, de poussières et d'écailles d'anciennes peintures au plomb et ceci, principalement chez les enfants, (3) inhalation de poussières fines émises dans l'atmosphère à partir de sources générant du plomb et (4) consommation d'eau chargée lors de son séjour dans des canalisations riches en plomb. De ce fait, les voies d'absorption de Pb sont principalement digestive et respiratoire. Quelle que soit la voie d'exposition, la quantité de Pb absorbée est influencée par les caractéristiques physico-chimiques (taille des particules ingérées et/ou inhalées, solubilité, nature du dérivé de Pb, etc.), mais également par les caractéristiques physiologiques de l'Homme (âge, statut nutritionnel en fer, calcium, etc.). Parmi les maladies engendrées par une exposition au plomb, le saturnisme infantile est un problème de santé publique majeur dans les pays industrialisés. En effet, les enfants âgés de moins de six ans représentent une population à risque car sont particulièrement sensibles aux effets de Pb, en particulier au niveau cérébral (Ernhart, 2006). Des déficits d'apprentissage peuvent être observés pour des plombémies relativement basses considérées comme sans seuil (Tong et al., 2000 ; Lanphear et al., 2005 ; Jusko et al., 2008). Le rapport d'évaluation sur Pb publié en avril 2010 « Lead in Food » par l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) fait état d'effets neurotoxiques, cardiovasculaires et rénaux, associés à des plombémies inférieures à 100 µg/L. Ces données interrogent sur la pertinence du seuil actuel de prise en charge des enfants (plombémies supérieures à 100 µg/L) et sur les actions de santé publique qui devraient être entreprises pour limiter l'exposition à Pb de la population en générale. Récemment, le Haut Conseil de la Santé Publique (HSCP) a préconisé une politique de réduction des expositions au plus bas niveau possible pour tenir compte des effets sans seuil du plomb (HCSP, 2014). En France, 50% des enfants dans la classe d'âge de 1 à 6 ans et 75% des adultes de la classe d'âge de 18 à 74 ans présentent une plombémie supérieure à 15 µg/L (Etchevers et al., 2010; Fréry et al., 2011). Pour 2017, le HCSP fixe les objectifs suivants de diminution de la plombémie de la population générale : (1) une plombémie moyenne attendue de 12 μ g/L et (2) 98% de la population avec une plombémie inférieure à 40 μ g/L. Il propose également deux niveaux de plombémie pour organiser la prévention du saturnisme infantile : (1) un niveau d'intervention rapide de 50 µg/L (au lieu de 100 µg/L) et (2) un niveau de vigilance de 25 µg/L. L'exposition alimentaire (denrées alimentaires et eau de boisson) est la voie principale d'exposition au plomb. Mais dans certains contextes environnementaux, les poussières domestiques et les sols contaminés par Pb constituent également une source importante d'exposition des populations, ce qui nécessite de mesurer la plombémie des personnes exposées et/ou de réaliser une analyse approfondie du risque. Dans le sang, 98% de Pb se retrouve dans le compartiment intra-érythrocytaire, le reste est lié à l'albumine. Le plomb sanguin est ensuite distribué dans le tissu osseux et les tissus mous tels que le cerveau, les reins et le foie. Chez un adulte, la demi-vie de Pb dans le sang et les tissus mous varie entre 28 et 36 jours (ATSDR, 2007) alors que dans le tissu osseux, la demi-vie est comprise entre 10 et 30 ans. Le tissu osseux constitue un réservoir endogène d'exposition au plomb, même lorsque cesse l'exposition. Le plomb accumulé peut être libéré dans le sang pendant toute la vie d'un individu (Inserm, 2008). Chez l'enfant, la demi-vie de Pb serait plus courte en raison d'une activité métabolique plus élevée et d'un taux élevé de renouvellement du tissu osseux. Cependant, comme le squelette des enfants est plus petit en proportion et qu'il stocke moins de Pb, une plus grande quantité est stockée dans les tissus mous (ATSDR, 2007).

Sur les communes de Courcelles-lès-Lens, Evin-Malmaison et Noyelles-Godault, un dépistage systématique du saturnisme a été mis en place par l'InVS entre les années 1999 et 2007 auprès des enfants âgés de 2 à 3 ans entrant en première année d'école maternelle. Sur ce secteur, une diminution de la prévalence du saturnisme de 17,3% à 3,7% liée à la fermeture de Metaleurop Nord en 2003 a été mise en évidence entre les années 1999-2000 et 2003-2004 (diminution de la moyenne géométrique de la plombémie de 63,5 μ g/L à 30,0 μ g/L; Declercq et Beaubois, 2001; Declercq et Ladrière, 2005). Le dépistage réalisé en 2006-2007 a estimé la moyenne à 30,6 μ g/L. En 2012, six ans après, un nouveau dépistage du saturnisme infantile a été mené. Malgré les limites liées à la représentativité de l'échantillon (avec un faible taux participation de 37%), les résultats sont considérés comme étant en faveur d'une baisse des plombémies moyennes observées depuis 2007. La moyenne dans l'échantillon (17,1 μ g/L; Heyman et al., 2014) demeure cependant supérieure à la moyenne régionale des enfants de 1 à 6 ans estimé en 2008-2009 (13,7 μ g/L; Etchevers et al., 2010). Cette valeur reste compatible avec une augmentation du risque de perte de capacité intellectuelle tel que mis en exergue dans les récents avis de l'EFSA (2013). Malgré les améliorations constatées, l'exposition des populations vivant aux alentours de l'ancien site Metaleurop Nord reste une préoccupation.

Le cadmium est naturellement présent dans l'environnement mais aussi à de fortes concentrations dans certains sites du fait des activités humaines (métallurgie, mines, etc.). Les effets toxiques en lien avec l'exposition professionnelle ont été largement étudiés. Une exposition de courte durée à de fortes concentrations de poussières ou de fumées est irritante pour les cellules des systèmes respiratoires et gastro-intestinaux. L'effet le mieux connu est la toxicité rénale (ATSDR, 1999). Les études épidémiologiques ont montré qu'une exposition de très longue durée pouvait amplifier le déclin de la fonction rénale observée au cours du vieillissement (Lauwerys et al., 1980). En 1993, Cd a été classé comme cancérogène (groupe 1 par le Centre International de Recherche sur le Cancer) chez l'Homme sur la base de données épidémiologiques en milieu professionnel et d'expérimentations animales. L'exposition par inhalation induit principalement un risque cancérogène. Le cadmium est également un contaminant de la chaîne alimentaire potentiellement préoccupant. Par conséquent, une réglementation a été progressivement mise en place en France puis à l'échelle de l'Union Européenne,

basée sur la fixation de teneurs maximales de Cd dans les denrées. En 2009, l'EFSA a abaissé la dose hebdomadaire tolérable provisoire de 7 µg Cd par kg de poids corporel à une dose hebdomadaire tolérable de 2,5 µg Cd par kg de poids corporel (EFSA, 2009). Ces valeurs toxicologiques de référence sont basées sur l'observation des effets rénaux consécutifs à une exposition chronique à de faibles doses de Cd. La demi-vie d'élimination sanguine du Cd est de l'ordre de 100 jours et celle d'élimination biologique est comprise entre 10 et 30 ans (Pichard, 2004). L'exposition chronique des individus est estimée d'après la charge en Cd du cortex rénal, elle-même déterminée d'après la cadmiurie (i.e. concentration de Cd dans les urines). La modélisation de l'ensemble de ces données a conduit à retenir une valeur d'imprégnation critique de 1 µg Cd par g de créatine urinaire, considérée comme le seuil de préoccupation (EFSA, 2009). Des études réalisées par l'InVS (Institut de Veille Sanitaire) en France ont mis en évidence des niveaux moyens d'environ 0,30 µg Cd par g de créatine à Salsigne et sa région (RNSP & INSERM, 1997), ainsi qu'à Marseille (ORS PACA-InVS, 2001) et de 0.27 µg Cd par g de créatine dans l'étude nationale sur les incinérateurs (AFSSA & InVS, 2006). La mesure du cadmium urinaire est un bon indicateur de la charge rénale en Cd chez l'adulte ; mais chez l'enfant, pour qui la charge rénale en Cd varie peu en raison d'un temps d'accumulation trop court, le cadmium sanguin se révèle être un biomarqueur plus pertinent (Heyman et al., 2008). La mesure de la cadmiéimie traduit une exposition récente, mais aussi la charge corporelle quand l'exposition est faible. Elle permet, en cas de pollution, d'évaluer la surexposition de l'enfant à ce polluant.

Une étude sur l'imprégnation au Cd de la population du secteur d'étude (10 communes autour de Metaleurop Nord et Nyrstar) a été réalisée en 1996-1997 (Leroyer et al., 2001). La cohorte d'enfants étudiés présentait une cadmiéimie (moyenne géométrique de 0,51 μ g/L) significativement supérieure à celle d'enfants témoins (0,47 μ g/L). En revanche, en ce qui concerne la cadmiurie, les différences entre les enfants exposés et les témoins n'étaient pas significatives (1,16 μ g/g de créatine *versus* 0,99 μ g/g de créatine). En ce qui concerne les adultes, les données publiées montrent que les adultes exposés ont en moyenne une cadmiémie (moyenne géométrique de 0,97 μ g/L pour les hommes et de 0,84 μ g/L pour les femmes) plus élevée que les adultes témoins (respectivement 0,67 μ g/L pour les hommes et 0,56 μ g/L pour les femmes).

Une exposition conjointe à Pb et Cd accentue et potentialise les effets délétères de ces deux composés sur le rein (EFSA, 2010). Au regard des rejets importants en Zn des deux fonderies, ce métal a également été considéré dans de nombreuses études. Le zinc est certes un élément essentiel pour l'Homme puisqu'il joue un rôle important notamment dans la croissance, le développement, les fonctions neurologiques et l'immunocompétence. Néanmoins, lorsque les concentrations sont importantes, cet élément peut avoir un impact sur la santé humaine. La toxicité aigüe se manifeste par des troubles gastro-intestinaux. L'effet toxique chronique provoque, quant à lui, l'anémie, la neutropénie et une diminution de la réponse immunitaire (INRS, 2002; Pichard, 2003b; ATSDR, 2005).

Mes travaux de recherche s'inscrivent dans les travaux menés sur le site atelier Metaleurop au sein du LGCgE-ISA Lille qui m'ont permis d'étudier plus spécifiquement l'exposition de la population à Cd, Pb et Zn dans différentes matrices en introduisant la notion de bioaccessibilité.

II.2. Bioaccessibilité orale des métaux dans les sols

II.2.1. Diagnostic de la contamination des sols sur le secteur d'étude

Depuis 1994, le LGCgE-ISA Lille a constitué une banque de terres associée à une base de données. Cette base rassemble des échantillons de terre collectés au niveau des horizons organo-minéraux (0 – 25 cm) dans le secteur affecté à des degrés variés par les émissions passées des deux usines métallurgiques. Elle concerne principalement l'échantillonnage de parcelles agricoles (labours et prairies) mais également de parcelles urbaines (potagers, pelouses, aires de jeux) et dans une moindre mesure, de parcelles boisées (haies, forêts, bois, bosquets, talus...). Plus précisément, mes travaux de recherche ont porté sur 390 échantillons issus de parcelles agricoles, 215 échantillons issus de sols urbains (essentiellement des sols de potagers) et 65 échantillons de sols boisés (Figure II.1).



Figure II.1. Localisation des échantillonnages de sols agricoles (n = 390), urbains (n = 215) et boisés (habitats ligneux, n = 65) sélectionnés dans le cadre de mes travaux de recherche

Pour chacun de ces sols, leur degré de contamination en métaux a été évalué et leurs concentrations pédo-anthropiques ont été comparées avec celles mesurées dans des sols agricoles de la région situés dans des secteurs suffisamment éloignés de toute source de contamination pour être considérés comme des références (Tableau II.1).

Tableau II.1. Distribution des concentrations totales (en mg/kg) en Cd, Pb et Zn dans les échantillons de sol
étudiés sur le secteur d'étude en comparaison des teneurs agricoles habituelles régionales

			Cd	Pb	Zn
				(mg/kg)	
		min	0,9	42	100
	Sols agricoles	moyenne	3,5	153	311
	(n = 390)	médiane	2,8	115	253
e		max	15,0	854	1292
tud		min	1,0	62	108
d'é	Sols urbains	moyenne	8,2	565	894
ur	(n = 215)	médiane	6,1	420	629
ecte		max	31,4	3026	6908
Sc		min	0,4	73	50
	Sols boisés	moyenne	10,4	555	751
	(n = 65)	médiane	6,4	366	488
		max	62,7	6002	7263
əs		min	0,03	13	24
uə.	TAH*	moyenne	0,44	32	68
éfén	(n = 232)	médiane	0,41	29	67
Rı		max	1,36	198	206

*Teneurs agricoles habituelles, tous matériaux parentaux confondus (Sterckeman et al., 2002)

Ces valeurs de référence, aussi appelées TAH (teneurs agricoles habituelles), correspondent « aux gammes de concentrations observées le plus fréquemment dans les horizons de surface des sols agricoles soumis à des pratiques agricoles usuelles, en l'absence de pollutions industrielles ou minières ou de contaminations majeurs » (Baize, 2001). Ces données tiennent compte uniquement de l'usage

agricole des sols. Il n'y a pas, à ce jour en région, de valeurs de référence pour les autres usages de sols (urbains et boisés). Les sols du secteur d'étude, quel que soit leur usage, présentent des concentrations en métaux qui excédent largement celles des TAH (Tableau II.1). L'usage des sols est connu pour influer sur leur enrichissement en polluants métalliques (Des Ligneris et al., 1999 ; Douay et al., 2008a, 2009). Outre les retombées de poussières sur ces sols en lien avec les activités industrielles passées, cette forte contamination peut être expliquée par d'autres activités anthropiques passées ou actuelles (apports de matériaux contaminés, retombées atmosphériques liées à la circulation automobile et au chauffage urbain, pratiques culturales des jardiniers comme l'utilisation d'eaux pluviales récupérées sur les toitures poussiéreuses pour l'irrigation, des remaniements, l'utilisation massive de produits phytosanitaires...), la corrosion des matériaux de construction, etc. De plus, la filtration des poussières des aérosols et des gaz par la canopée des arbres tend à accroître la contamination des sols boisés (Nieminen et al., 1999 ; van Oort et al., 2009). La diversité des activités anthropiques passées ou actuelles du secteur étudié multiplie fortement les sources potentielles de contamination des sols j es activités métallurgiques représentant la principale source.

Quels que soient leurs usages, les sols du site atelier présentent des concentrations en Cd, Pb et Zn qui dépassent largement les TAH. Qu'en est-il de l'exposition des populations vivant sur ce secteur en lien avec l'ingestion de ces particules de sol ? Plus spécifiquement, mes travaux de recherche ont été menés afin d'étudier l'influence (1) de l'usage du sol, (2) de la spéciation des métaux dans le sol, (3) des paramètres physico-chimiques et (4) du mode de gestion des sols sur la bioaccessibilité orale de Cd, Pb et Zn.

II.2.2. Influence de l'usage du sol sur la bioaccessibilité orale

J'ai estimé la bioaccessibilité orale de Cd, Pb et Zn, au moyen du test *in vitro* UBM, dans 490 échantillons de sols sélectionnés sur le site atelier Metaleurop, à savoir : 390 échantillons issus de parcelles agricoles, 50 échantillons de sols urbains (pelouses et potagers) et 65 échantillons de sols boisés (haies, forêts, bois, bosquets, talus...) dont les caractéristiques physico-chimiques sont présentées dans le Tableau II.2 [9].

		Argile	Limons	Sables	pН	CaCO ₃ tot	МО	P_2O_5	Fe libre	Mn libre	Al libre	Fe tot	Mn tot	Al tot
		g/kg	g/kg	g/kg		g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg
	min	84	94	63	5.0	1	15	0,017	0,16	0,06	0,09	3,22	0,04	0,56
Sols	max	681	777	782	8.6	280	177	2,659	37,3	0,56	1,41	71,3	0,91	64,5
agricoles	moyenne	198	537	266	7.6	14	38	0,425	3,26	0,24	0,32	22,1	0,37	9,08
(n = 390)	ecartype	67	161	176	0.7	36	20	0,244	3,36	0,10	0,19	10,9	0,14	6,36
	médiane	181	548	209	7.9	3	31	0,390	2,56	0,23	0,25	19,2	0,36	7,77
	min	81	260	130	6.3	1	24	0,040	1,07	0,08	0,14	8,84	0,18	4,19
Sols	max	289	699	629	8.3	102	213	2,680	6,86	0,46	1,03	22,6	0,64	11,3
urbains	moyenne	206	532	262	7.4	29	87	0,782	3,30	0,20	0,43	17,1	0,35	7,94
(n = 50)	ecartype	47	100	112	0.5	33	48	0,625	1,20	0,07	0,18	3,28	0,10	1,56
	médiane	210	532	238	7.5	12	81	0,633	3,48	0,19	0,40	17,3	0,33	7,92
	min	76	247	60	4.1	1	26	0,016	0,38	0,01	0,13	8,47	0,03	3,68
a	max	452	743	677	8.2	149	400	2,011	10,7	0,60	1,35	37,3	0,92	13,3
Sols bolses	moyenne	222	478	300	7.0	35	92	0,233	4,46	0,17	0,50	16,6	0,30	7,68
(n = 05)	ecartype	73	112	146	1.2	42	62	0,279	2,33	0,11	0,28	5,20	0,17	1,78
	médiane	220	476	289	7.4	10	79	0,203	4,78	0,15	0,42	15,8	0,27	7,40

Tableau II.2. Paramètres physico-chimiques des échantillons de sols selon leurs usages (agricole, urbain, boisé)

Granulométrie (NF X 31-107) ; pH (eau ; NF ISO 10390) ; carbonates (CaCO₃ tot ; NF ISO 10693) ; matières organiques (MO ; NF ISO 10694) ; phosphore assimilable (P_2O_5 ; extraction à l'oxalate d'ammonium NF X 31-161) ; concentrations en Fe, Mn et Al libres (Mehra et Jackson, 1960) ; concentrations pseudototales en Fe, Mn et Al (eau régale) [55]

Globalement, ces sols montrent des textures limono-argilo-sableuse à sablo-limoneuse avec une forte variabilité des paramètres physico-chimiques selon les usages mais également au sein d'un même usage de sol. En moyenne, les résultats mettent en évidence : (1) des teneurs en carbonates, en matières organiques et en oxydes/oxyhydroxydes de Fe, Mn et Al plus importantes dans les sols urbains et boisés que dans les sols agricoles ; (2) des teneurs en phosphore assimilable plus élevées

dans les sols urbains que dans les sols agricoles et boisés ; (3) une forte variabilité des valeurs de pH dans les différents usages. Les différences observées s'expliquent notamment par les pratiques culturales pour les sols agricoles, par la présence de remblais/débris et/ou les pratiques en lien avec le jardinage pour les sols urbains.

Les concentrations bioaccessibles de Cd, Pb et Zn (exprimées en % par rapport aux concentrations pseudototales) mesurées dans les phases gastrique (G) et gastro-intestinale (GI) pour les 3 usages de sols sont présentées Figure II.2. Quel que soit l'usage du sol, $Cd_{bioaccessible} > Pb_{bioaccessible} > Zn_{bioaccessible}$ dans les deux phases. De plus, quel que soit le métal, la bioaccessibilité dans la phase gastrique (G) est supérieure à celle dans la phase gastro-intestinale (GI). De la variabilité des paramètres physico-chimiques des sols selon leurs usages résulte également une certaine variabilité du comportement et de la bioaccessibilité orale des métaux :

- Cd est en moyenne plus bioaccessible dans les sols agricoles (77,3% et 46,2% respectivement dans les phases G et GI) que dans les sols boisés (74,8% dans G et 30,7% dans GI) et les sols urbains (68,0% dans G et 30,0% dans GI) ;
- Pb est en moyenne plus bioaccessible dans les sols boisés (65,1% dans G et 24,9% dans GI) que dans les sols urbains (59,8% dans G et 24,4% dans GI) et dans les sols agricoles (57,6% dans G et 20,8% dans GI);
- Zn est en moyenne plus bioaccessible dans les sols urbains (45,3% dans G et 18,6% dans GI) et dans les sols boisés (45,1% dans G et 13,4% dans GI) que dans les sols agricoles (32,0% dans G et 8,6% dans GI).



Phase gastrique Phase gastro-intestinale



Les différences de bioaccessibilité observée entre les métaux, à savoir une plus faible bioaccessibilité pour Zn et une plus forte pour Cd, seraient principalement dues aux différentes formes chimiques dans lesquelles les métaux sont liées avec les constituants du sol **[20]**. La bioaccessibilité des métaux est réduite significativement dans la phase GI. Dans l'environnement intestinal, caractérisé par un pH proche de la neutralité ($6,3 \pm 0,5$) et riche en carbonates, les métaux subissent un certain nombre de processus (tels que la complexation, l'adsorption sur des particules de sol ou des constituants du chyme, et/ou la précipitation sous forme de composés insolubles) les rendant ainsi moins bioaccessibles (Davis et al., 1997 ; Basta et Gradwohl, 2000 ; Grøn et Andersen, 2003).

Au sein d'un même usage de sol, une forte variabilité de la fraction bioaccessible est observée. Ce résultat suggère que le type d'habitat ou les pratiques culturales ont une influence sur les paramètres physico-chimiques des sols, les concentrations pseudototales en métaux et la bioaccessibilité de ceuxci. La plus forte bioaccessibilité de Cd mesurée dans les sols agricoles indique une plus forte disponibilité environnementale de cet élément en comparaison des sols urbains et boisés. Le cadmium lié à des constituants du sol comme les carbonates ou les oxydes de fer et de manganèse pourrait être plus facilement solubilisé dans les fluides digestifs **[20]**. En revanche, les plus faibles bioaccessibilités de Cd mesurées dans les sols urbains et boisés pourraient s'expliquer par la présence de complexes plus stables (e.g. avec les matières organiques) moins facilement solubilisés dans les solutions gastro-intestinales.

Les sols urbains et boisés étudiés sont caractérisés par de fortes teneurs en matières organiques et carbonates et montrent une bioaccessibilité de Pb plus importante que dans les sols agricoles. Des études ont mis en évidence une forte bioaccessibilité de Pb dans des sols présentant des teneurs faibles en matières organiques (Tang et al., 2008 ; Saminathan et al., 2010). Ainsi, les résultats observés dans mes expérimentations suggèrent que Pb est lié à d'autres constituants du sol que la matière organique (e.g. carbonates, oxydes de Fe/Mn) qui sont labiles au regard du test UBM **[20]**. Dans les sols fortement carbonatés, il a été montré des associations fortes entre Pb et les carbonates rendant Pb fortement bioaccessible au niveau de l'environnement très acide de l'estomac (Denys et al., 2007). D'autres minéraux peuvent jouer un rôle significatif dans la bioaccessibilité de Pb. Les bioaccessibilités plus faibles mesurées dans les sols agricoles peuvent être attribuées à la présence de complexes Pb-minéraux plus stables (e.g., sulfates et phosphates), insolubles dans les conditions d'extraction du test UBM (Ruby et al., 1999 ; Porter et al., 2004).

Le zinc présente un comportement assez similaire à Pb, à savoir une bioaccessibilité plus importante dans les sols urbains et boisés que dans les sols agricoles. Très peu d'études ont été recensées dans la littérature sur la bioaccessibilité de Zn dans les sols. Les différences observées entre les usages de sol peuvent être attribuées à la présence de complexes plus ou moins stables et donc plus ou moins solubles dans les fluides digestifs **[20]**.

Les différences de bioaccessibilité orales des métaux observées dans les sols selon leurs usages peuvent aussi s'expliquer par le ratio métal-ligand dans les solutions digestives. Dans les sols urbains et boisés étudiés, pour lesquels les concentrations pseudototales en métaux sont les plus élevées, les sites de liaison sur les ligands peuvent se trouver rapidement saturés par les métaux, induisant ainsi une augmentation ou une diminution de la bioaccessibilité de Cd, Pb et Zn. De plus, les métaux peuvent être en compétition avec les sites de liaison disponibles sur les constituants du sol et/ou ceux du chyme **[9]**.

Bilan : Comparés aux sols agricoles, les sols urbains et boisés présentent des caractéristiques physico-chimiques particulières en lien avec une forte pression anthropique. Des spécificités des paramètres physico-chimiques de ces sols résultent également des différences de bioaccessibilité orale des métaux. Les sols agricoles, caractérisés par de plus faibles teneurs en matières organiques et carbonates, présentent une bioaccessibilité de Cd plus forte que les autres usages de sol. Les sols urbains et boisés, caractérisés par de plus fortes teneurs en matières organiques et carbonates, montrent une bioaccessibilité de Pb et Zn plus importante que dans les sols agricoles. Les résultats observés entre les trois usages de sol indiquent que la bioaccessibilité orale de Cd, Pb et Zn dépend de la spéciation des métaux, des paramètres physico-chimiques du sol et de leurs concentrations pseudototales.

II.2.3. Influence de la spéciation des métaux dans le sol sur la bioaccessibilité orale

Le sol est un milieu très complexe qui se distingue par une partie minérale dite « inerte » constituée essentiellement de minéraux primaires (quartz, feldspaths, micas) issus de la roche mère et par une partie minérale dite « active » constituée des argiles, d'oxydes et hydroxydes métalliques. Le sol se compose également d'une fraction organique (humus, organismes vivants, débris végétaux et animaux). Au sein de la fraction minérale, les principaux composés susceptibles de retenir les éléments métalliques sont les argiles, les carbonates, les oxydes et hydroxydes de fer, d'aluminium et de manganèse (Baize, 1997 ; Bataillard, 2002 ; Brunel, 2005). Les phénomènes d'interactions entre les éléments métalliques et les constituants minéraux et organiques du sol sont généralement regroupés sous le terme de spéciation.

A l'origine, la spéciation définit l'état de valence d'un élément (Conil et Clozel, 1999). Cette notion a été étendue dans le domaine de la science du sol à l'étude des modes d'associations et de localisation des cations ou anions sur ou dans la matrice (Conil et Clozel, 1999). Dans ce mémoire, la spéciation est définie par l'association d'un élément avec les différentes phases porteuses du sol (argiles, matières organiques, carbonates, oxy/hydroxydes de fer, de manganèse, d'aluminium...). On parle plus communément de distribution du contaminant au sein des phases porteuses plutôt que de spéciation au sens strict. La distribution des éléments métalliques peut être appréhendée par des méthodes physiques (DRX, EXAFS, MEB-EDS) et chimiques (extractions séquentielles) (Reeder et al., 2006). Les éléments métalliques dans les sols se présentent sous un mélange complexe de phases solides et de morphologies différentes. Aussi, la spéciation est souvent identifiée comme un paramètre influençant l'exposition des organismes aux éléments métalliques et, ainsi, la biodisponibilité (Peijnenburg et Jager, 2003). Pour l'Homme, il a été montré qu'en fonction de la phase minéralogique à laquelle les métaux sont liés, l'absorption gastro-intestinale est différente (Davis et al., 1997; Ruby et al., 1999). Les mécanismes de digestion humaine, mettant en jeu des phénomènes chimiques et biologiques, auront pour effet potentiel de modifier les liaisons entre le contaminant et la matrice et pourront ainsi rendre les métaux disponibles pour l'absorption gastro-intestinale. Pour la matrice sol, différents mécanismes de fixation entre les constituants du sol et les métaux peuvent être mis en place et affecter ainsi la bioaccessibilité. Peu d'études se sont intéressées aux processus physiques et chimiques qui régissent la bioaccessibilité orale des contaminants dans les sols, et pourquoi ils sont dissous dans le tractus gastro-intestinal. Ruby et al. (1999) ont montré que la biodisponibilité de Pb, suite à l'ingestion de terre, dépend de la spéciation mais également de la taille des particules ingérées et de l'encapsulation des phases minéralogiques au sein de la matrice (Figure II.3).

Mes travaux de recherche se sont focalisés sur la spéciation de Cd, Pb et Zn dans les sols agricoles du site atelier Metaleurop **[20]**. La méthode des extractions chimiques séquentielles a été utilisée afin d'identifier les phases porteuses des métaux qui permettraient d'expliquer la bioaccessibilité mesurée sur ces sols au moyen du test UBM. Plus spécifiquement, les expérimentations ont été réalisées sur 36 échantillons de terre présentant un large degré de contamination (de 2,4 à 13,0 mg/kg pour Cd, de 104 à 824 mg/kg pour Pb et de 182 à 1250 mg/kg pour Zn).



Figure II.3. Diagramme schématisant comment les espèces de Pb, la taille des particules et les morphologies affectent la biodisponibilité orale de ce métal (Ruby et al., 1999)

Les extractions chimiques séquentielles telles que recommandées par le BCR¹ (Rauret et al., 1999) et fondées sur les travaux de Tessier et al. (1979), permettent de définir, en fonction des réactifs utilisés, les compartiments du sol auxquels seraient préférentiellement liés les métaux. La part de métaux a ainsi été évaluée dans quatre compartiments distincts du sol :

- la fraction acido-soluble relative aux métaux dits échangeables, fixés sur les argiles et les matières organiques ou liés aux carbonates (**fraction A**);
- la fraction réductrice relative aux métaux liés aux oxydes et/ou hydroxydes de Fe, Al ou Mn (fraction B);
- la fraction oxydable relative aux métaux liés aux matières organiques et aux sulfures (fraction D);
- la fraction résiduelle relative aux métaux piégés dans la matrice alumino-silicatée des minéraux primaires et secondaires (**fraction R**).

Les résultats des extractions séquentielles réalisées sur les 36 échantillons de terre (Figure II.4) montrent que : (1) Cd est réparti pour l'essentiel entre les fractions A et B, (2) Pb est fortement lié à la fraction B et (3) Zn est réparti entre les fractions A, B et la fraction résiduelle R. J'ai réalisé une analyse statistique (régressions linéaires multiples) entre les données relatives à la bioaccessibilité et les concentrations en métaux mesurées dans les différentes fractions. Les équations obtenues sont présentées Tableau II.3 [20]. 58 à 93% de la variance de la bioaccessibilité orale des métaux sont expliquées par la part des métaux dans les fractions A, B, D et/ou R. La fraction A contribue positivement à la bioaccessibilité de Cd, Pb et Zn dans les deux phases G et GI. Dans la phase G, la fraction B contribue positivement aux concentrations bioaccessibilité dans la phase G, tandis que la fraction D contribue positivement à la concentration de ce métal dans la phase GI.





La majorité des études recensées dans la littérature porte sur la bioaccessibilité orale de Pb et peu d'études s'intéressent à Cd et Zn. Aussi, il a été montré que, dans les sols, Pb lié aux carbonates et aux oxydes de Fe/Mn peut être dissout dans les conditions gastro-intestinales (Ruby et al., 1999; Hettiarachchi et Pierzynski, 2004; Marschner et al., 2006; Bosso et Enzweiler, 2007; Lamb et al., 2009), tandis que les plus faibles valeurs de bioaccessibilité de Pb sont attribuées à la présence de

¹ Community Bureau of Reference (appelé aujourd'hui Standards, Measurement and Testing Program)

complexes minéraux plus stables tels que des sulfates, phosphates ou sulfures de Pb (Davis et al., 1993; Ruby et al., 1999; Porter et al., 2004). Il est fait l'hypothèse que des comportements similaires peuvent être observés pour Cd et Zn. En effet, il a été établi que les paramètres majeurs gouvernant la distribution de Cd, Pb et Zn dans les sols sont le pH, les teneurs en matières organiques, en ligands inorganiques et en oxydes métalliques, la minéralogie des argiles et la compétition avec les autres ions métalliques (Lothenbach et al., 1999; Davranche et Bollinger, 2000; Violante et al., 2003; Abollino et al., 2006).

Tableau II.3. Relations entre les concentrations bioaccessibles de Cd, Pb et Zn (mg/kg) et les fractions des extractions séquentielles (mg/kg) établies par régressions linéaires multiples (pas à pas descendantes, p < 0,0001)

Variable	Equations	r^2
Cd	Cd.bioacc $G = 0.78 + 0.82 [Cd]_A + 0.74 [Cd]_B$	0,79
Cu	Cd.bioacc $GI = 0.84 + 0.65 [Cd]_A$	0,79
Dh	Pb.bioacc G = -17,5 + 2,75 $[Pb]_A$ + 0,69 $[Pb]_B$ - 2,58 $[Pb]_D$	0,86
10	Pb.bioacc GI = $-5,54 + 2,17 \text{ [Pb]}_{A} + 0,20 \text{ [Pb]}_{B}$	0,58
7	Zn.bioacc G = $-34,4 + 0,83$ [Zn] _A + 0,26 [Zn] _B + 0,41 [Zn] _R	0,93
Zn	Zn.bioacc GI = $-4,79 + 0,37 [Zn]_A + 0,26 [Zn]_D$	0,93

bioacc G : phase gastrique ; bioacc GI : phase gastro-intestinale ; A : fraction acido-soluble ; B : fraction réductrice ; D : fraction oxydable ; R : fraction résiduelle

Dans le cadre de mes expérimentations, j'ai mis en évidence des relations positives et significatives entre les concentrations en métaux bioaccessibles dans la phase G et les fractions A et B des extractions séquentielles [20]. Dans la solution gastrique (pH faible de 1,5), les métaux sont libérés de la matrice sol via la désorption et/ou dissolution des carbonates et d'une partie des oxydes. Pour Cd, la somme des fractions A et B correspond à la concentration bioaccessible. Pour Pb et Zn, la somme des concentrations correspondant à ces fractions est nettement supérieure à la concentration bioaccessible, ce qui est attribué à la présence de minéraux de Pb et Zn plus stables dans les conditions gastriques. De plus, une corrélation positive significative est observée entre la bioaccessibilité de Zn et la fraction R, indiquant que ce métal lié à la phase minérale argileuse pourrait être partiellement désorbé et/ou solubilisé. Dans le tractus gastro-intestinal, l'absorption des métaux a lieu préférentiellement à un pH proche de la neutralité. A ce pH, la spéciation change et les espèces les plus bioaccessibles (ions libres) sont transformées en espèces moins solubles. Ces conditions favorisent la réadsorption des métaux sur les particules de sol ou autres matériaux présents dans le chyme (Davis et al., 1997), diminuant ainsi leur solubilité et absorption. Marschner et al. (2006) ont montré une forte corrélation entre la bioaccessibilité de Pb et la quantité de ce métal dans la fraction B. Dans mes expérimentations, j'observe une relation similaire (Tableau II.3). De plus, la bioaccessibilité de Zn est fortement corrélée à la quantité de ce métal dans la fraction D, montrant que les processus d'oxydation dans l'intestin auraient un rôle plus important pour l'absorption de Zn que la dissolution initiale dans l'estomac. D'après Marschner et al. (2006), la concentration de métal soluble dans la phase intestinale dépend de la disponibilité des ligands plus que de la solubilité de l'élément dans la phase G. En effet, à faible pH, les sites de liaison des métaux dans les sols (oxydes, argiles, carbonates, matière organique) sont partiellement solubilisés. Les métaux solubilisés sont réadsorbés ou précipités à pH neutre dans la phase intestinale. La démobilisation des métaux durant le passage de la phase gastrique à la phase intestinale pourrait résulter d'une redistribution des métaux parmi les fractions de l'extraction séquentielle. Ainsi, la concentration de métal soluble dans la phase intestinale est plus une fonction de la disponibilité des ligands que des métaux solubilisés pendant la phase G.

Le type d'association des éléments métalliques avec le sol est un facteur important dans la compréhension du processus de biodisponibilité. Selon les propriétés physico-chimiques spécifiques à chaque composé métallique et la nature de la matrice sol, différents mécanismes de fixation peuvent être mis en place. En fonction des mécanismes mis en jeu, la dissolution des éléments métalliques dans le tractus digestif (i.e. la bioaccessibilité) pourra être diminuée ou augmentée.

II.2.4. Influence des paramètres physico-chimiques du sol sur la bioaccessibilité orale

Ce travail a reposé sur : (1) l'estimation de la bioaccessibilité orale de Cd, Pb et Zn dans les sols au moyen du test UBM et (2) l'étude de l'influence des propriétés physico-chimiques des sols sur la bioaccessibilité des métaux par l'élaboration d'un modèle mathématique **[9, 16, 52, 53]**. Au regard des connaissances et du nombre d'échantillons disponibles sur le site atelier Metaleurop, la démarche a été axée sur ce secteur.

Pour les sols agricoles, il a été montré l'existence d'un gradient de contamination selon la distance aux fonderies (Douay et al., 2001a). En revanche, pour les sols urbains et boisés, il ne semble pas exister de relation simple entre le degré de contamination des sols et la distance aux sources (Douay et al., 2008a, 2009). En effet, les concentrations mesurées dans ces sols sont souvent bien plus importantes que celles mesurées dans les sols agricoles situés dans un même contexte environnemental. Ceci est expliqué par des apports anthropiques autres que ceux liés aux activités des deux fonderies (apports culturaux, de matériaux contaminés, remaniements...). De ces modes de contamination des sols résulte une certaine variabilité des paramètres physico-chimiques et probablement, du comportement des métaux.

Au regard des données disponibles sur le site atelier, il a été fait le choix d'élaborer le modèle sur les sols agricoles qui présentent une variabilité en termes de paramètres physico-chimiques et de degré de contamination. Ceci s'explique par la relative diversité des matériaux parentaux des sols du secteur (craie, argile tertiaire, dépôts lœssiques, colluviaux ou alluviaux), la source de contamination (Metaleurop Nord, Nyrstar) et par la distance à l'usine. Le modèle élaboré a ensuite été validé à partir de données obtenues sur un jeu d'échantillons non utilisés pour son élaboration. La dernière étape a consisté à regarder les réponses du modèle obtenu sur les sols agricoles en intégrant des données élaborés sur des sols présentant d'autres usages (sols urbains et boisés).

II.2.4.1. Elaboration du modèle et validation sur les sols agricoles

La méthodologie et les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication [16] insérée ci-dessous.

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.

En résumé...

L'élaboration et la validation du modèle ont été réalisées à partir de 390 échantillons de sols agricoles sélectionnés dans la banque de terre du LGCgE-ISA Lille. Ce jeu de données a été séparé en 2 sets : un set de 280 échantillons pour l'élaboration du modèle et un set de 110 échantillons pour sa validation. Dans un premier temps, j'ai sélectionné, par une étude statistique (corrélation de Pearson, calcul des indices de multicolinéarité), les principaux paramètres physico-chimiques des sols pour décrire la bioaccessibilité des métaux. Ont été intégrées dans la modélisation les teneurs en matières organiques, carbonates, sables, phosphore assimilable, Fe et Mn libres, Fe et Al pseudototales et la concentration pseudototale du métal (Cd, Pb ou Zn). J'ai mené une seconde étude statistique (échantillonnage stratifié, classification ascendante hiérarchique) en réalisant une typologie des sols agricoles en vue de définir la population optimale à considérer parmi les 280 échantillons pour obtenir un modèle robuste et représentatif du secteur d'étude considéré. Huit classes ont été différenciées. L'échantillonnage stratifié a ensuite consisté à déterminer le poids de chaque classe et donc le nombre de sous échantillons à prendre dans chacune d'elles afin de construire le modèle de régression. Le modèle a été établi à partir des populations obtenues à chaque étape au moyen d'une régression linéaire multiple (pas à pas descendante). A chaque étape, 6 équations prédisent la bioaccessibilité de Cd, Pb et Zn dans les phases gastrique et gastro-intestinale. Chaque équation a ensuite été testée avec la totalité des 280 échantillons. Pour choisir l'étape apportant le modèle le plus robuste et le plus représentatif, des indicateurs statistiques d'écart (tels que le biais, l'erreur quadratique moyenne et le coefficient de détermination r_p^2) ont été calculés pour les valeurs de bioaccessibilité mesurées et prédites pour chaque échantillon.

Les principales variables gouvernant la bioaccessibilité orale de Cd, Pb et Zn dans les sols agricoles étudiés sont les teneurs en carbonates, en matières organiques, en sables, en phosphore assimilable et les concentrations pseudototales en Al, Fe-Mn libres et en métaux. De plus, les corrélations obtenues montrent que l'utilisation d'une importante base de données est nécessaire pour élaborer un modèle robuste prédictif de la bioaccessibilité orale des métaux dans les sols étudiés (n = 186 pour Cd, 233 pour Pb et 280 pour Zn).

Dans un second temps, j'ai validé le modèle établi pour prédire la bioaccessibilité de Cd, Pb et Zn dans les phases G et GI à partir du set de 110 échantillons. Les résultats montrent que :

- les équations sélectionnées lors de l'élaboration du modèle prédisent avec succès la bioaccessibilité de Cd dans la phase G et celle de Pb et Zn dans les phases G et GI, avec des r_p² supérieurs à 0,84 ;
- la prédiction de la bioaccessibilité de Pb dans la phase G est la plus précise ($r_p^2 = 0.97$), tandis que celle de Cd dans la phase GI est la moins précise ($r_p^2 = 0.62$);
- globalement, les valeurs de bioaccessibilité prédites sont très proches de celles mesurées, excepté pour Cd dans la phase GI où les valeurs prédites pour les plus faibles concentrations bioaccessibles (< 1 mg/kg) sont légèrement surestimées ;
- dans tous les cas, les indicateurs statistiques d'écart sont très faibles, montrant la performance du modèle élaboré.

Environmental Pollution 160 (2012) 130-138

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Environmental Pollution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envpol

Bioaccessibility of trace elements as affected by soil parameters in smelter-contaminated agricultural soils: A statistical modeling approach

Aurélie Pelfrêne^{a,b,*}, Christophe Waterlot^{a,b}, Muriel Mazzuca^{a,c}, Catherine Nisse^{a,c,d}, Damien Cuny^{a,c,e}, Antoine Richard^f, Sébastien Denys^g, Christophe Heyman^h, Hélène Rousselⁱ, Géraldine Bidar^{a,b}, Francis Douay^{a,b}

^c UDSL, EA 4483, Impact de l'Environnement Chimique sur la Santé Humaine, 59000 Lille, France

^d CHU Lille, Service de Pathologie Professionnelle et Environnement, 59000 Lille, France

e Faculté des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques, Laboratoire des Sciences Végétales et Fongiques, 3 rue du Professeur Laguesse, 59000 Lille, France

^f Laboratoire d'Analyses des Sols, Institut National de la Recherche Agronomique, 273 rue de Cambrai, 62000 Arras, France

^g INERIS, Parc Technologique ALATA, Verneuil-en-Halatte, France

^h Cellule InterRégionale d'Epidémiologie Nord-Pas de Calais Picardie (Cire), 62 boulevard de Belfort, 59024 Lille, France

ⁱ Département Sites et Sols pollués, ADEME, 21 rue du Grésillé, 49000 Angers, France

A R T I C L E I N F O

Article history: Received 9 June 2011 Received in revised form 2 September 2011 Accepted 3 September 2011

Keywords: Trace elements Contaminated soil Bioaccessibility Soil parameters Model

ABSTRACT

An investigation was undertaken to identify the most significant soil parameters that can be used to predict Cd, Pb, and Zn bioaccessibility in smelter-contaminated agricultural soils. A robust model was established from an extended database of soils by using: (i) a training set of 280 samples to select the main soil parameters, to define the best population to be taken into account for the model elaboration, and to construct multivariate regression models, and (ii) a test set of 110 samples to validate the ability of the regression models. Total carbonate, organic matter, sand, P₂O₅, free Fe–Mn oxide, and pseudototal Al and trace element (TE) contents appeared as the main variables governing TE bioaccessibility. The statistical modeling approach was reasonably successful, indicating that the main soil factors influencing the bioaccessibility of TEs were taken into account and the predictions could be applicable for further risk evaluation in the studied area.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The major sources of trace elements (TEs) in the environment are metal mining and smelting activities, which can result in considerable soil contamination. Soils enriched with TEs such as Cd, Pb, and Zn pose a potential threat to human health if directly ingested or transferred through food. Accidental ingestion of soil is considered an important pathway of TE exposure, especially for children through outdoor hand-to-mouth activities (Day et al., 1979; Duggan et al., 1985; Wixson and Davies, 1994). The daily intake of soil via oral ingestion was estimated to range from 50 to 200 mg day⁻¹ (Van Wijnen et al., 1990). Human health risk assessments of TE-contaminated soils are most often based on

* Corresponding author. E-mail address: aurelie.pelfrene@isa-lille.fr (A. Pelfrêne). limited site-specific contaminant data and on total (or pseudototal) concentrations. This practice suggests that bioaccessibility, defined as the fraction of contaminant that is soluble in the gastrointestinal environment and potentially available for absorption (Oomen et al., 2002; Paustenbach, 2000; Ruby et al., 1999), is conservatively and, possibly, erroneously assumed to be 100% in traditional health risk assessment calculations, implying that the entire ingested contaminant is available for uptake into the bloodstream. Research on bioaccessibility relating to contaminated land management has attracted attention at an international level and has been ongoing for more than 10 years (Basta and Gradwohl, 2000; Hamel et al., 1999; Juhasz et al., 2007; Pelfrêne et al., 2011; Roussel et al., 2010; Ruby et al., 1996; Van de Wiele et al., 2007; Wragg and Cave, 2003; Yang et al., 2003). At a given site, information on TE bioaccessibility, in contrast to total contaminant concentrations, can therefore promote a more proportionate and cost-effective assessment of contaminated land (Alexander, 2000; Brandon





^a Université Lille Nord de France, 59000 Lille, France

^b Groupe ISA, Equipe Sols et Environnement, Laboratoire Génie Civil et géo-Environnement Lille Nord de France (LGCgE), EA 4515, 48 boulevard Vauban, 59046 Lille cedex, France

^{0269-7491/\$ -} see front matter @ 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved. doi:10.1016/j.envpol.2011.09.008

et al., 2006; Ollson et al., 2009; Ruby et al., 1999). In a recent study (Latawiec et al., 2010), a debate was conducted on the use of bioaccessibility data for contaminated land management. The authors showed that bioaccessibility data offer an effective decisionsupport tool and that consideration of bioaccessible values can refine risk assessments, aid decision-making, and facilitate sustainable land management. Bioaccessibility considerations can assist decision-makers in situations where the effectiveness of alternative contamination assessment methods is limited. Latawiec et al. (2010) also suggest that a greater commitment should be made with respect to developing a standardized approach to the use of bioaccessibility data. From this perspective, the Bioaccessibility Research Group of Europe (BARGE) has developed a unified method (the unified bioaccessibility method, UBM) with the aim of producing a validated and standardized procedure (Cave et al., 2006) that could be used for contaminated soils in human health risk assessment (Broadway et al., 2010; Button et al., 2009; Caboche et al., 2010; Denys et al., 2007, 2008; Pelfrêne et al., 2011; Roussel et al., 2010). The UBM has undergone preliminary interlaboratory trials (Wragg et al., 2009) and was validated against an in vivo model (young swine) for Cd and Pb by Caboche (2009).

TEs are associated with the various components in soils in different ways, and these associations indicate both their mobility and their availability. A wider range of soil properties (mineralogy, soil pH, organic matter, clay, iron, manganese, aluminum oxide, and phosphorus contents) could also influence TE bioaccessibility, as reported in some studies (Basta et al., 2005; Denys et al., 2007; Fairbrother et al., 2007; Pelfrêne et al., 2011; Roussel et al., 2010; Ruby, 2004). Not all forms of soil contaminants are available for absorption (i.e., bioavailable). Bioavailability and bioaccessibility of soil contaminants, as defined above, will vary depending on the chemical form and solubility of the TE present (Ruby et al., 1993; Roussel et al., 2010; Pelfrêne et al., 2011). In order to accurately assess the health risk posed by TE-contaminated sites, an improved understanding of the influence of soil properties on the bio-accessibility of TEs is needed. In a previous study, Pelfrêne et al.

(2011) developed a model predicting the bioaccessibility of Cd, Pb, and Zn in agricultural soils located in an area highly affected by the past atmospheric emissions of two smelters in northern France. This study was conducted on a limited number of soil samples (n = 36) and the authors concluded that a further study was needed to validate and generalize the relationships obtained on TE human bioaccessibility. In order to confirm or invalidate the recently reported results on this study area, this paper presents a new statistical modeling approach to establish a robust model from an extended database of 390 soil samples by using: (i) a training set of 280 samples to select the main soil parameters, to define the best population to be taken into account for the model elaboration, and to construct multivariate regression models, and (ii) a test set of 110 samples to testify the ability of the regression models.

2. Materials and methods

2.1. Sampling sites

The study area is located in the former coal-mining area of northern France where considerable atmospheric emissions of dust were generated by two smelters (the lead smelter Metaleurop Nord at Noyelles-Godault and the zinc smelter Umicore at Auby; Fig. 1) from the latter part of the nineteenth and through much of the twentieth century. These atmospheric discharges highly contaminated the soils around the smelters. Several works have dealt with the contamination of agricultural and urban soils caused by the smelter fallout (Sterckeman et al., 2002; Douay et al., 2008, 2009).

A 180-km² surface was considered as the studied area (Fig. 1) and 390 sites were chosen surrounding two neighboring smelters in order to represent large-scale metal contamination of soil. The sampled sites were chosen randomly according to the agricultural land management in order to avoid a potential effect of the culture type on the samples.

2.2. Characterization of top soils

For each site, a composite topsoil sample was constituted from the ploughed layer (0–25 cm). The 390 soil samples were prepared according to the NF ISO 11464 standard. The samples were air-dried at a temperature below 40 $^{\circ}$ C and crushed to pass through a 2-mm stainless steel sieve. Particle-size distribution was obtained through sedimentation and sieving (NF X 31–107). Soil pH was measured in a water



Fig. 1. Location of the 390 sampled sites in northern France.

suspension (NF ISO 10390), and organic matter content was obtained by the NF ISO 10694 standard. Total carbonate content was obtained by measuring the volume of CO_2 released after a reaction with HCl (NF ISO 10693). Assimilated P (expressed in g P_2O_5 kg⁻¹ of soil) was measured using an extraction by ammonium oxalate solution and spectrocolorimetric determination (NF X 31–161). All these analyses were performed by the INRA Soil Analysis Laboratory (Arras, France) accredited by COFRAC (French Accreditation Committee) according to the ISO 17025 standard.

For each of the 390 soil samples, a representative subsample was obtained with an automatic sieve using an ultracentrifugal mill <250 μ m (Retsch type ZM 200, Germany). The pseudototal element concentrations (Cd, Pb, Zn, Fe, Mn, and Al) in the soil subsamples were obtained by microwave-assisted digestion (Berghof Speed-waveTM MWS-2, Germany). For this, 300 mg of soil subsamples was digested in a mixture of 1.5 mL nitric acid (70%) and 4.5 mL hydrochloric acid (37%) (aqua regia). Quality control was based on a certified sample (BCR CRM 141R) and provided good recoveries for Cd, Pb, Zn, and Mn (89–107%, n = 5). For Al and Fe, there are no certified values. However, the recovery for Fe was compared to an indicative value (Waterlot et al., 2011) and was 89%. Single extraction with a mix 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 (Mehra and Jackson, 1960). The concentrations were measured by atomic absorption spectrometry (AAS, AA-6800, Shimadzu, Japan) using a flame (FAAS).

2.3. In vitro oral bioaccessibility measurement

We measured the bioaccessibility of Cd, Pb, and Zn in the 390 subsamples. The in vitro test, based on the unified bioaccessibility method (UBM), was used to simulate the chemical processes occurring in the mouth, stomach, and intestinal compartments using synthetic digestive solutions according to physiological transit times (Cave et al., 2006). The four simulated fluids (saliva, gastric fluid, duodenal fluid, and bile) were prepared individually 1 day before the extraction (Pelfrêne et al., 2011; Roussel et al., 2010). In the UBM procedure, 0.6 g of the under-250µm dried and homogenized soil sample was placed in a centrifuge tube and mixed with 9 mL of simulated saliva at pH 6.5 for 5 min; 13.5 mL of simulated gastric solution was added at pH 0.9-1.0 to give a final pH ranging from 1.2 to 1.7. In the present study, the gastric juice pH was adjusted to 1.50 \pm 0.05. The tubes were shaken end-over-end at 37 °C for 1 h and centrifuged at 3000 g for 5 min. The first stage constituted the gastric-only phase of the extraction technique. To simulate the gastric and intestinal phases together, a duplicate gastric phase solution was produced and 27 mL of simulated duodenal fluid and 9 mL of simulated bile solution were added to give a final pH ranging from 5.8 to 6.8. The tubes were shaken endover-end at 37 °C for 4 h and centrifuged at 3000 g for 5 min. The second phase constituted the gastrointestinal phase of the extraction technique. The resulting supernatants were removed and bioaccessible concentrations of Cd, Pb, and Zn were measured by FAAS. In vitro TE bioaccessibility was determined in triplicate soil samples. To evaluate analytical recovery, a blank and a NIST Standard Reference Material (SRM 2710 and 2710a) were used. Mean recoveries in SRM 2710 (n = 22)and SRM 2710a (*n* = 17) ranged from 93 to 108%, 88 to 109%, and 91 to 109% for Cd, Pb, and Zn, respectively, in the gastric phase, and from 89 to 109%, 88 to 109%, and 90 to 112% for Cd, Pb, and Zn, respectively, in the gastrointestinal phase.

2.4. Model calibration and validation

The 390 sites were divided into two sets to create a training set (280) and a test set (110) (Fig. 1).

The first approach consisted in model calibration from the set of 280 soil samples. This training set was used to: (i) select the main soil parameters to describe TE bioaccessibility, (ii) define the best population to be taken into account among the 280 soil samples for the model elaboration, and (iii) construct regression models. Because collinearity between some soil parameters can have significant effects on regression results, a first selection, among the 13 soil parameters recorded in the database, was required to avoid a redundancy. It is important that the models have physical significance and their parameters make sense scientifically (Anderson and Basta, 2009). Previous studies showed that the soils in this area were heterogeneous (large spatial variability and high contamination) (Sterckeman et al., 2002; Douay et al., 2006: Pelfrêne et al., 2011). To define the best population to be taken into account for the model elaboration, a statistical analysis (stratified sampling) was conducted on 280 soil samples. An ascending hierarchical clustering (Euclidean distance and aggregation by Ward's method) was performed on the physicochemical data (pH, contents of OM, total CaCO₃, clay, sand, silt, and pseudototal Cd, Pb, and Zn) after standardization of these variables (mean of 0 and standard deviation of 1 for each parameter). To construct regression models, several steps were conducted: from step 1 with the smallest population to step x with the full set of 280 samples. For each step, the size of the sample in each subpopulation, established by ascending hierarchical clustering, was taken in proportion to the size of the subpopulation. Random sampling was made within each subpopulation. The selected samples at each step were used for training and the full set of 280 samples was used for testing and calibrating the models elaborated in the different steps. The models were run using a linear multiple regression with a downward stepwise procedure to determine the most salient soil parameters for calculating TE bioaccessibility in the

gastric and gastrointestinal phases. Multivariable regression was employed using the selected independent variables. The least significant variables (as measured by the largest *p*-value) were removed one at a time until all the remaining variables were significant at the 95th percentile confidence level (p < 0.05).

The second approach consisted in model validation from the test set of 110 soil samples. These samples were selected using a regular 1000×1000 -m grid laid over the survey area. Within each cell a sampling site was randomly chosen. The test set was not included in the construction of the models but was used to testify the ability of the regression models.

Statistical analyses were performed using STATISTICA (Statsoft 6.1, Tulsa, OK, USA) or XLSTAT 2010.6.01 (Addinsoft).

2.5. Model performance evaluation

The mean error (ME), the root mean square error (RMSE), and the coefficient of determination (r_p^2) were calculated from the measured and predicted bioaccessible values in each soil sample to compare the accuracy of predictions and the ability of the model to simulate TE bioaccessibility:

$$ME = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} (B_i - B_i^*)$$
(1)

RMSE =
$$\left[\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} (B_i - B_i^*)^2\right]^{1/2}$$
 (2)

$$r_p^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (B_i^* - B_i)^2}{\sum_{i=1}^n (B_i - \overline{B})^2}$$
(3)

where B_i is the measured bioaccessibility at location i, B_i^* is the predicted bioaccessibility at location i, \overline{B} is the mean of the measured values, and n is the sample size. The ME provides a measure of bias; the RMSE provides a measure of accuracy; and r_p^2 expresses the proportion of the original variance accounted for the model predictions. Smaller ME and RMSE values indicate fewer errors.

3. Results and discussion

3.1. General properties of the soils

The soils around the former Metaleurop Nord smelter developed mainly on loessic materials, while those around Umicore originated from alluvial deposits characterized by a large textural variability (Sterckeman et al., 2000). The main physicochemical parameters of the sampled soils are presented in Table 1. The studied soils around Umicore have significantly higher sand contents than those around Metaleurop Nord. On average, the soil pH is approximately 7.6. Significant variations were observed in the values for total carbonates, organic matter, assimilated P, free Fe oxide, and pseudototal Fe and Al contents. Only free Mn and Al oxide and pseudototal Mn contents showed a lower variation. Regarding the major pollutants (Cd, Pb, and Zn), the lowest and highest concentrations were as follows: 0.9 and 15.0 mg kg⁻¹ for Cd, 42 and 854 mg kg⁻¹ for Pb, and 100 and 1292 mg kg⁻¹ for Zn.

3.2. Gastric and gastrointestinal bioaccessibility of Cd, Pb, and Zn in soils

In vitro bioaccessibility of Cd, Pb, and Zn measured in the 390 soil samples ranged, respectively, (i) from 0.4 to 13.6 mg kg⁻¹, 13 to 568 mg kg⁻¹, and 6 to 634 mg kg⁻¹ of soil for the gastric phase, and (ii) from 0.1 to 5.5 mg kg⁻¹, 2 to 172 mg kg⁻¹, and 0.2 to 251 mg kg⁻¹ of soil for the gastrointestinal phase (Table 1). The mean values of the bioaccessible fractions of Cd, Pb, and Zn during the gastric phase were $78 \pm 14\%$, $58 \pm 10\%$, and $32 \pm 10\%$, respectively, of the pseudototal concentrations in the soils. During the gastrointestinal phase, the bioaccessible fractions of Cd, Pb, and Zn decreased to $46 \pm 19\%$, $21 \pm 9\%$, and $9 \pm 4\%$, respectively. In near-neutral pH and the carbonate-rich environmental of the intestinal phase, TEs may be stabilized in solution by processes of complexation, by read-sorption on remaining soil particles or other indigestible materials present in chyme, and/or by precipitation as relatively insoluble

Table 1

Mean, standard deviation (SD), minimum, maximum, first quartile (Q_1), median, and third quartile (Q_3) values (n = 390) of topsoil physicochemical parameters, and pseudototal and human bioaccessible (gastric and gastrointestinal phases) concentrations.

			Mean	SD	Min	Max	Q1	Median	Q3
Clay		g kg ⁻¹	198	67	84	681	156	181	227
Silt		$\mathrm{g}~\mathrm{kg}^{-1}$	537	161	94	777	399	548	692
Sand		$\mathrm{g}~\mathrm{kg}^{-1}$	266	176	63	782	108	209	413
pH water			7.6	0.7	5.0	8.6	7.3	7.9	8.1
Total CaCO ₃		$\mathrm{g}~\mathrm{kg}^{-1}$	13.8	36.1	1.0	280.0	2.0	3.0	7.0
Organic matter		$\mathrm{g}~\mathrm{kg}^{-1}$	37.9	19.6	14.9	177.0	26.7	30.6	42.2
Assimilated P		$\mathrm{g}~\mathrm{kg}^{-1}$	0.425	0.244	0.017	2.659	0.267	0.390	0.538
Free Fe oxide		$\mathrm{g}~\mathrm{kg}^{-1}$	3.26	3.36	0.16	37.27	0.80	2.56	5.06
Free Mn oxide		$\mathrm{g}~\mathrm{kg}^{-1}$	0.24	0.10	0.06	0.56	0.16	0.23	0.31
Free Al oxide		$\mathrm{g}~\mathrm{kg}^{-1}$	0.32	0.19	0.09	1.41	0.17	0.25	0.45
Pseudototal Fe		g kg ⁻¹	22.09	10.94	3.22	71.28	14.45	19.23	28.65
Pseudototal Mn		g kg ⁻¹	0.37	0.14	0.04	0.91	0.27	0.36	0.48
Pseudototal Al		$\mathrm{g}~\mathrm{kg}^{-1}$	9.08	6.36	0.56	64.51	5.68	7.77	9.81
Pseudototal	Cd	mg kg $^{-1}$	3.5	2.3	0.9	15.0	1.9	2.8	4.5
	Pb	mg kg $^{-1}$	153	116	42	854	79	115	178
	Zn	mg kg ⁻¹	311	202	100	1292	170	253	366
Gastric bioaccessibility	Cd	mg kg ⁻¹	2.7	1.8	0.4	13.6	1.5	2.2	3.4
	Pb	mg kg $^{-1}$	90	77	13	568	44	67	105
	Zn	mg kg $^{-1}$	109	97	6	634	47	80	132
Gastrointestinal	Cd	mg kg ⁻¹	1.5	0.9	0.1	5.5	0.8	1.3	1.9
bioaccessibility	Pb	mg kg^{-1}	31	27	2	172	15	22	35
-	Zn	mg kg ⁻¹	31	33	0.2	251	10	22	40

compounds (Basta and Gradwohl, 2000; Davis et al., 1997; Grøn and Andersen, 2003), allowing them to be less bioaccessible. The mean values of the bioaccessible fractions of Cd, Pb, and Zn in the gastrointestinal phase were <50%, indicating that a significant portion of the total soil-borne TE concentration may not be available following incidental soil ingestion. However, for human health risk assessment, the TE bioaccessible fraction in the gastrointestinal phase is more physiologically relevant, but those in the gastric phase would provide a more conservative assessment.

3.3. Calibration of models

3.3.1. Selection of relevant physicochemical parameters

A statistical analysis was made to evaluate the effects of multicollinearity and to select the significant parameters (Pearson's correlation, $\alpha = 0.01$). Specifically, a significant linear correlation was observed between organic matter and clay contents (r = 0.59, p < 0.0001) explained by the formation of stable complexes between these constituents (Stevenson, 1994). Significant correlations were also recorded between free Fe and Al oxide and clay contents (r = 0.40 and 0.41, respectively, p < 0.0001), which points out that most of the clay minerals are coated with amorphous metal oxides (Yin et al., 2002). Additionally, significant correlations were observed between pseudototal Al and pseudototal Fe (r = 0.20, p < 0.0001), free Mn oxide and pseudototal Mn (r = 0.79, p < 0.0001), free Al oxide and pseudototal Al (r = 0.69, p < 0.0001), free Fe oxide and free Al oxide (r = 0.77, p < 0.0001), pseudototal Cd and Pb (r = 0.86, p < 0.0001), pseudototal Cd and Zn (r = 0.87, p < 0.0001), and pseudototal Pb and Zn (r = 0.61, p < 0.0001) contents.

The variance inflation factor (VIF) and the corresponding tolerance values were then determined to quantify the severity of the observed multicollinearity. Values for VIF that are 1.0 or slightly higher suggest that the variables do not show multicollinearity and that the parameter estimates are reliable. Collinearity becomes an issue when values of VIF exceed 2.0 (Graham, 2003). Thus, only the following soil parameters, having a VIF <2, were included in the multiple regression analysis: contents of organic matter (1.6), total carbonates (1.2), sand (1.8), assimilated P (1.1), free Fe oxides (1.6), free Mn oxides (1.4), and pseudototal Fe (1.6) and Al (1.7). Because the pH values of the soil-digestive solution mix were adjusted in the UBM test at 1.5 \pm 0.05 in the gastric phase and 6.3 \pm 0.5 in the gastrointestinal phase, soil pH was selected as a parameter to be omitted from analysis.

3.3.2. Typology of the agricultural soil samples

Ascending hierarchical clustering was performed on the physicochemical data (sand, organic matter, total CaCO₃, and pseudototal Cd, Pb, and Zn contents, and pH) of the 280 soils. According to this statistical analysis, these agricultural soils were classified into eight well-differentiated groups. Table 2 shows the main characteristics of each group. Soils in group A are characterized by a high proportion of silt and high pH; group B by the lowest average pH and total CaCO₃ contents; group C by low contents of total CaCO₃

Table 2

Aean values (±SD) of physicochemical	parameters and pseudototal T	TE concentrations of the eight	groups of analyzed soils.
--------------------------------------	------------------------------	--------------------------------	---------------------------

Groups	п	Clay (g kg^{-1})	Silt (g kg ⁻¹)	Sand (g kg^{-1})	pН	$CaCO_3$ tot (g kg ⁻¹)	$OM (g kg^{-1})$	Cd tot (mg kg $^{-1}$)	Pb tot (mg kg $^{-1}$)	Zn tot (mg kg $^{-1}$)
Α	26	214 ± 35	636 ± 67	149 ± 46	$\textbf{8.0}\pm\textbf{0.3}$	$\textbf{18.4} \pm \textbf{27.4}$	$\textbf{35.9} \pm \textbf{10.2}$	$\textbf{4.8} \pm \textbf{1.0}$	239 ± 60	376 ± 74
В	17	210 ± 65	461 ± 107	329 ± 106	6.1 ± 0.5	1.2 ± 0.4	50.3 ± 15.6	$\textbf{2.9} \pm \textbf{1.2}$	121 ± 45	294 ± 130
С	86	180 ± 44	418 ± 76	402 ± 129	$\textbf{8.0}\pm\textbf{0.4}$	5.8 ± 5.5	29.7 ± 7.4	$\textbf{3.3} \pm \textbf{1.5}$	128 ± 67	317 ± 161
D	16	353 ± 122	426 ± 105	222 ± 121	7.5 ± 0.5	11.8 ± 15.9	$\textbf{88.3} \pm \textbf{35.3}$	$\textbf{6.8} \pm \textbf{2.2}$	255 ± 117	595 ± 194
Е	90	185 ± 35	703 ± 71	112 ± 52	$\textbf{7.7} \pm \textbf{0.5}$	12.2 ± 27.0	$\textbf{33.1} \pm \textbf{10.6}$	$\textbf{2.3} \pm \textbf{0.8}$	112 ± 42	192 ± 60
F	16	249 ± 69	590 ± 76	162 ± 81	$\textbf{7.9} \pm \textbf{0.3}$	34.7 ± 40.3	42.8 ± 16.5	$\textbf{9.3}\pm\textbf{2.2}$	451 ± 164	740 ± 268
G	23	131 ± 28	271 ± 64	599 ± 170	$\textbf{7.0} \pm \textbf{0.9}$	2.5 ± 2.0	$\textbf{28.9} \pm \textbf{11.8}$	$\textbf{2.2} \pm \textbf{0.8}$	73 ± 38	216 ± 66
Н	6	296 ± 41	606 ± 50	98 ± 15	$\textbf{8.2}\pm\textbf{0.2}$	231.8 ± 37.3	$\textbf{68.1} \pm \textbf{16.2}$	7.1 ± 1.4	385 ± 94	514 ± 87

n, Number of soil samples in each group.

and organic matter; group D by the highest contents of total CaCO₃ and organic matter; group E by the highest proportion of clay and relatively low organic matter contents; group F by a high proportion of silt and intermediate contents of total CaCO₃ and organic matter; group G by the highest contents of sand and the lowest organic matter contents; and group H by the highest average pH and total CaCO₃ contents. In general, the soil samples are highly polluted by TEs and the contamination degree of these agricultural soils is significantly higher than that of reference regional soils (on average, 0.44, 32, and 68 mg kg⁻¹, respectively for Cd, Pb, and Zn; Sterckeman et al., 2002).

3.3.3. Predicting Cd, Pb, and Zn bioaccessibility

A multiple regression analysis was performed to study the dependence of the oral bioaccessible fraction of Cd, Pb, and Zn on the corresponding pseudototal TE concentrations and soil physicochemical parameters. The ascending hierarchical clustering provided evidence for eight groups (Table 2). Model calibration was conducted by performing several steps using the set of 280 soil samples. Step 1 consisted in the elaboration of models using the smallest sample population by taking one random soil sample in the smallest group (group H; Table 2) and *n* random samples in the other groups in relation to the size of the group. The model calibration required six steps of data analysis to be performed. The selected samples at each step were used for model elaboration. The full set of 280 samples was used to test and calibrate the models elaborated in the six steps. In order to discriminate the best predictive models among the six steps, the ability of the models to simulate TE bioaccessibility was quantified using RMSE, ME, and r_p^2 (Table 3). Only significant models and their constitutive variables are presented here (Table 4 and Fig. 2).

3.3.3.1. Cadmium. For Cd, the results showed: (i) high RMSE values for steps 1 and 2 and a significant decrease of these values toward stability from step 4 to step 6 for the gastric and gastrointestinal phases; (ii) high ME values for steps 1 to 3 for both phases; and (iii) variations of r_p^2 between the six steps for the gastric phase with a maximum value for step 4 and an increase of r_p^2 from step 1 to step

Table 3

The prediction accuracy of different steps for model elaboration.

	Steps					
	1	2	3	4	5	6
	(n=47)	(n=93)	(n=141)	(n=186)	(n=233)	(n=280)
RMSE (mg kg	-1)					
Cd.bioacc G	0.75	0.62	0.60	0.59	0.59	0.59
Cd.bioacc Gl	0.68	0.68	0.63	0.60	0.60	0.60
Pb.bioacc G	25.4	25.2	23.6	24.0	23.2	23.1
Pb.bioacc Gl	17.8	17.5	17.1	17.0	16.9	16.6
Zn.bioacc G	30.7	31.1	30.3	30.8	30.3	29.7
Zn.bioacc Gl	12.8	12.9	11.6	11.6	11.5	11.3
ME (mg kg ⁻¹)					
Cd.bioacc G	-0.019	0.070	-0.017	0.005	-0.025	0.0001
Cd.bioacc Gl	0.034	0.036	0.050	0.010	0.007	0.0001
Pb.bioacc G	2.055	-0.076	-1.064	-1.576	0.277	0.001
Pb.bioacc Gl	-1.948	-1.121	-1.487	-1.247	0.124	0.0007
Zn.bioacc G	-0.802	-1.047	-0.707	-1.896	0.192	-0.012
Zn.bioacc Gl	-2.282	-1.325	-0.693	-0.489	0.208	-0.001
r_p^2						
Ċd.bioacc G	0.83	0.90	0.89	0.97	0.90	0.90
Cd.bioacc Gl	0.38	0.37	0.46	0.51	0.52	0.52
Pb.bioacc G	0.89	0.89	0.90	0.90	0.91	0.91
Pb.bioacc Gl	0.61	0.62	0.64	0.64	0.65	0.66
Zn.bioacc G	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	0.90
Zn.bioacc Gl	0.85	0.84	0.87	0.87	0.88	0.88

Where: RMSE, root mean square errors; ME, mean errors; r_p^2 , coefficient of determination; *n*, number of soil samples in each step.

4 for the gastrointestinal phase. According to these results, the steps 4 (with 186 soil samples) for bioaccessible Cd in the gastric and gastrointestinal phases were selected to represent the best predictive models.

Significant correlations (p < 0.0001) were found between concentrations extracted with UBM, pseudototal Cd concentrations, and selected physicochemical parameters (Table 4 and Fig. 2). These interrelations showed that 90% of the variability in Cd bioaccessibility in the gastric phase is explained by pseudototal Al and Cd contents, whereas the carbonate, free Fe oxide, and pseudototal Cd contents can explain nearly 46% of the variability in Cd bioaccessibility in the gastrointestinal phase.

Aside from the positive effect on bioaccessibility of pseudototal soil TEs, some parameters were found to reduce TE solubility while others seem to increase it. In the gastric phase, pseudototal Al content was found to increase Cd solubility. This recorded positive relationship showed that Cd bound to Al oxides and/or aluminosilicate minerals might dissolve during the gastric phase where pH conditions are very low. In the gastrointestinal phase, free Fe oxide content had a positive effect, whereas total carbonate level had a negative contribution. In the intestinal environment (near-neutral pH), Cd may have co-precipitated with oxides in the soil and the observed positive correlation showed that the Cd binding sites are partly solubilized and released during the UBM process. Total CaCO₃ content was found to reduce Cd solubility. This negative correlation suggests that carbonates may have increased the digestive juice pH. However, during the UBM process, the gastric pH value was adjusted (pH 1.5 ± 0.05) and the carbonates from soils were destroyed. In these conditions, calcium released from carbonates in the digestive solutions may form strong complexes with soil constituents or other materials present in chyme and with metals, allowing them to be less bioaccessible. The selected soil parameters cannot be considered as sufficient to model Cd bioaccessibility in the gastrointestinal phase. Some authors suggest that others parameters, such as metal speciation, could explain the TE bioaccessibility in soils (Caboche et al., 2010; Hund-Rink and Kördel, 2003; Rieuwerts et al., 1998).

3.3.3.2. *Lead.* For Pb, the results showed in both phases: (i) a slight decrease of RMSE values toward stability from step 5 to step 6; (ii) high ME values from steps 1 to 4 with a decrease for steps 5 to 6; and (iii) a slight increase of r_p^2 toward stability from step 5 to step 6. According to these results, the steps 5 (with 233 soil samples) for bioaccessible Pb in both phases were selected.

Significant correlations (p < 0.0001) were found between concentrations extracted with UBM, pseudototal Pb concentrations, and selected physicochemical parameters (Table 4 and Fig. 2). These results showed that there is a strong correlation for Pb bioaccessibility in the gastric phase ($r^2 = 0.90$), reflecting that 90% of the variability in Pb bioaccessibility could be described by carbonate, organic matter, assimilated P, and pseudototal Al and Pb contents, and 65% of the variability on Pb bioaccessibility in the gastrointestinal phase is explained by assimilated P and pseudototal Pb contents.

For Pb bioaccessibility, some variables and the extent of their influence were examined in other studies. In the gastric phase, total CaCO₃, organic matter, and pseudototal Al contents had a negative effect, whereas the assimilated P level had a positive contribution. The observed negative correlations provide evidence for a strong sequestration and decreased TE bioaccessibility in soils, remaining unaffected by the chemical conditions of the gastric and gastrointestinal environment. As reported by Sipos et al. (2005), Pb has a high affinity toward organic matter and forms strong complexes with organic ligands. The negative correlation between Pb bioaccessibility and organic matter content was also observed by

Table 4

Relationships between bioaccessible concentrations of Cd, Pb, and Zn and soil parameters as given by stepwise regression models (significance level: p < 0.0001).

Multiple linear regression equation	Explanatory variables in the best equation	Coefficient estimates	p-value	r^2
Cd				
Cd.bioacc G ~ Al tot + Cd tot				0.90
	Constant	-0.053	0.552	
	Al tot	0.012	0.049	
	Cd tot	0.75	<0.0001	
Cd.bioacc Gl \sim CaCO ₃ tot + Free Fe oxide + Cd tot				0.46
	Constant	0.56	< 0.0001	
	CaCO ₃ tot	-0.0024	0.041	
	Free Fe oxide	0.035	0.007	
	Cd tot	0.24	< 0.0001	
Pb				
Pb bioacc G ~ CaCO ₃ tot + OM + P_2O_5 + Al tot + Pb tot				0.90
	Constant	6.06	0.241	
	CaCO ₃ tot	-0.25	< 0.0001	
	OM	-0.42	< 0.0001	
	P ₂ O ₅	16.08	0.039	
	Al tot	-0.88	0.001	
	Pb tot	0.67	< 0.0001	
Pb.bioacc Gl ~ P_2O_5 + Pb tot				0.65
2.3.	Constant	-5.12	0.068	
	P ₂ O ₅	17.07	0.002	
	Pb tot	0.19	< 0.0001	
Zn				
Zn.bioacc G ~ CaCO ₃ tot + OM + Al tot + Zn tot				0.90
	Constant	17 71	< 0.0001	
	$CaCO_2$ tot	-0.12	0.012	
	OM	-0.27	0.019	
	Al tot	-1.03	0.0004	
	7n tot	0.47	< 0.0001	
7n bioacc Cl ~ sand + CaCO ₂ tot +	Lintot	0.17	<0.0001	0.88
Free Mn oxide + Al tot + Zn tot		05.05	0.0001	0.00
	Constant	-25.37	<0.0001	
	Sand	0.021	< 0.0001	
	CaCO ₃ tot	-0.13	< 0.0001	
	Free Mn oxide	20.24	0.008	
	AI tot	-0.34	0.004	
	Zn tot	0.16	< 0.0001	

Where: bioacc G and bioacc GI, bioaccessible metal in the gastric and gastrointestinal phases, respectively, in mg kg⁻¹; sand in g kg⁻¹; OM, organic matter in g kg⁻¹; total CaCO₃ in g kg⁻¹; Cd, Pb and Zn tot, pseudototal concentrations in mg kg⁻¹; free Fe oxide in g kg⁻¹; Al tot, pseudototal contents in g kg⁻¹; P₂O₅, assimilated P in g kg⁻¹.

Poggio et al. (2009) and Saminathan et al. (2010). As reported by Saminathan et al. (2010) and Caboche et al. (2010), the positive correlation observed between bioaccessible Pb and assimilated P shows that the Pb-P complexes present in soil are partly solubilized during the UBM process. In the gastrointestinal phase, Pb bioaccessibility was mainly driven by assimilated P load.

3.3.3.3. Zinc. For Zn, the results provided evidence for: (i) variations of RMSE values between the six steps for the gastric phase with a minimum value for step 6 and a slight decrease of RMSE values for the gastrointestinal phase; (ii) high ME values for steps 1 to 5 with a significant decrease for step 6 for both phases; and (iii) constant values of r_p^2 for the gastric phase and a slight increase of r_p^2 for the gastrointestinal phase. According to these results, the steps 6 (with 280 soil samples) were selected to represent the best predictive models for Zn bioaccessibility in both phases.

Significant correlations (p < 0.0001) were found between concentrations extracted with UBM, pseudototal Zn concentrations, and selected physicochemical parameters (Table 4 and Fig. 2). These interrelations showed that carbonate, organic matter, and pseudototal Al and Zn contents can explain 90% of the variability in Zn bioaccessibility in the gastric phase, and 88% of the variability in Zn bioaccessibility in the gastrointestinal phase is explained by sand, carbonate, free Mn oxide, and pseudototal Al and Zn contents. For Zn bioaccessibility, total CaCO₃, organic matter, and pseudototal Al contents were found to reduce Zn solubility in the gastric phase, indicating that Zn seems to be efficiently bound by common adsorbing soil phases. In the gastrointestinal phase, total CaCO₃ and pseudototal Al contents were found to reduce Zn solubility, while sand and Mn oxide contents seem to increase it. The occurrence of sand in our equation was also reported by Poggio et al. (2009).

In the reported multiple regression equations, the main variables governing TE bioaccessibility were total CaCO₃, organic matter, sand, assimilated P, pseudototal Al, free Fe and Mn oxide, and pseudototal TE contents.

Compared with the results reported by Pelfrêne et al. (2011), the correlations obtained in the present study confirm that the use of an extended database is needed to elaborate a robust model predicting TE bioaccessibility in the studied soils.

3.4. Validation of models

The approach consisted in validation of the resulting models from the test set of 110 soil samples (Fig. 2). The agreement between the measured and model-predicted bioaccessibility was quantified with the RMSE, ME, and r_p^2 values (Table 5). Results showed that: (i) the models can predict Cd bioaccessibility in the gastric phase and Pb and Zn bioaccessibility in the gastric and



Measured bioaccessibility (mg kg-1)

Fig. 2. Measured bioaccessibility versus predicted bioaccessibility of Cd, Pb, and Zn (in the gastric, G, and the gastrointestinal, GI, phases) for model calibration (training set, n = 280) and model validation (test set, n = 110).

Table 5Values of statistical parameters for model validation.

	Cd. bioacc G	Cd. bioacc Gl	Pb. bioacc G	Pb. bioacc Gl	Zn. bioacc G	Zn. bioacc Gl
r_p^2	0.92	0.62	0.97	0.84	0.95	0 93
ŔMSE (mg kg ⁻¹)	0.48	0.51	12.8	10.0	22.9	8.4
$ME (mg kg^{-1})$	0.03	-0.07	3.41	0.97	1.77	-0.62

Where: r_p^2 , coefficient of determination; RMSE, root mean square errors; ME, mean errors.

gastrointestinal phases quite successfully, with r_p^2 greater than 0.84; (ii) Pb bioaccessibility in the gastric phase had the highest prediction accuracy ($r_p^2 = 0.97$); (iii) for Cd bioaccessibility in the gastrointestinal phase, the model showed lower predictability ($r_p^2 = 0.62$); (iv) the regression lines between measured and predicted values were all close to the 1:1 line, except for Cd bioaccessibility in the gastrointestinal phase where the predicted low bioaccessible concentrations were overestimated; (v) the RMSE and the ME values for all models were low, suggesting a satisfactory and effective calibration of the models.

Globally, it can be clearly seen that the predicted bioaccessibility values in the gastric and gastrointestinal phases are in agreement with the measured values.

4. Conclusions

An investigation was undertaken to identify the most significant soil parameters that can be used to predict Cd, Pb, and Zn bioaccessibility in contaminated agricultural soils. Model calibration was conducted by performing several steps using a training set of 280 soil samples. In the gastric and gastrointestinal phases, steps 4 (with 186 soil samples), steps 5 (with 233 soil samples), and steps 6 (with 280 soil samples) were selected to represent the best predictive models for Cd. Pb. and Zn bioaccessibility, respectively, The main variables governing TE bioaccessibility were total CaCO₃. organic matter, sand, assimilated P, free Fe and Mn oxide, and pseudototal Al, Cd, Pb, and Zn contents. Model validation was conducted on a test set of 110 soil samples. Globally, the high correlations between measured and predicted values indicate that the main factors of soil influencing the bioaccessibility of TEs were taken into account and the use of an extended database is needed to elaborate a robust model predicting the TE bioaccessibility in the studied soils.

Traditionally, criteria for the assessment and remediation of contaminated sites have been derived using concentration-based standards and assuming that 100% of the contaminant is bioavailable. However, the results outlined in this paper clearly indicate that TE bioaccessibility in soils was significantly less than 100% (78%, 58%, and 32% for Cd, Pb, and Zn, respectively, in the gastric phase; 46%, 21%, and 9% for Cd, Pb, and Zn, respectively, in the gastrointestinal phase). These results show that the bioaccessibility predictions could be applicable for further risk evaluation.

The results were obtained only for the case of agricultural soils. Inclusion of other soil uses in this area (e.g., kitchen gardens, woody habitats) is needed to evaluate the empirical model of TE bioaccessibility developed with the data set for agricultural soils.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Nord-Pas de Calais Council and ADEME for the financial support of this research as part of the BIOMIS and BIOAC programs.

References

- Alexander, M., 2000. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. Environmental Science & Technology 34, 4259–4265.
- Anderson, R.H., Basta, N.T., 2009. Application of ridge regression to quantify marginal effects of collinear soil properties on phytoaccumulation of arsenic, cadmium, lead, and zinc. Environmental Toxicology and Chemistry 28, 619–628.
- Basta, N., Gradwohl, R., 2000. Estimation of Cd, Pb, and Zn bioavailability in smeltercontaminated soils by a sequential extraction procedure. Journal of Soil Contamination 9, 149–164.
- Basta, N.T., Ryan, J.A., Chaney, R.L., 2005. Trace element chemistry in residualtreated soil: key concepts and metal bioavailability. Journal of Environmental Quality 34, 49–63.
- Brandon, E.F.A., Oomen, A.G., Rompelberg, C.J.M., Versantvoort, C.H.M., van Engelen, J.G.M., Sips, A.J.A.M., 2006. Consumer product in vitro digestion model: bioaccessibility of contaminants and its application in risk assessment. Regulatory Toxicology and Pharmacology 44, 161–171.
- 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.
- Button, M., Watts, M.J., Cave, M.R., Harrington, C.F., Jenkin, G.T., 2009. Earthworms and in vitro physiologically-based extraction tests: complementary tools for a holistic approach towards understanding risk at arsenic-contaminated sites. Environmental Geochemistry and Health 31, 273–282.

- 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, Ph D Thesis. Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy.
- 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 A 45, 1264–1274.
- Cave, M., Wragg, J., Klinck, B., Grön, C., Oomen, T., Van de Wiele, T., Ollson, I., Koch, K., Reimer, N., Basta, N., Tack, K., Casteel, S., 2006. Preliminary assessment of a unified bioaccessibility method for arsenic in soils. International Conference in Epidemiology and Environmental Exposure. Paris, 2–6 September 2006.
- Davis, A., Ruby, M.V., Goad, P., Eberle, S., Chryssoulis, S., 1997. Mass balance on surface-bound mineralogic, and total lead concentrations as related to industrial aggregate bioaccessibility. Environmental Science & Technology 31, 37–44.
- Day, J.P., Fergusson, J.E., Chee, T.M., 1979. Solubility and potential toxicity of lead in urban street dust. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 23, 497–502.
- Denys, S., Caboche, J., Tack, K., Delalain, P., 2007. Bioaccessibility of lead in high carbonate soils. Journal of Environmental Science and Health A 42, 1331–1339.
- 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.
- Douay, F., Roussel, H., Pruvot, C., Waterlot, C., 2006. Impact of a smelter closedown on metal contents of wheat cultivated in the neighbourhood. Environmental Science and Pollution Research 15, 162–169.
- Douay, F., Pruvot, C., Roussel, H., Ciesielski, H., Fourrier, H., Proix, N., Waterlot, C., 2008. Contamination of urban soils in an area of northern France polluted by dust emissions of two smelters. Water Air and Soil Pollution 188, 247–260.
- Douay, F., Pruvot, C., Waterlot, C., Fritsch, C., Fourrier, H., Loriette, A., Bidar, G., Grand, C., de Vaufleury, A., Scheifler, R., 2009. Contamination of woody habitat soils around a former lead smelter in the North of France. Science of the Total Environment 407, 5564–5577.
- Duggan, M.J., Inskip, M.J., Rundle, S.A., Moorcroft, J.S., 1985. Lead in playground dust and on hands of schoolchildren. Science of the Total Environment 44, 65–79.
- Fairbrother, A., Wenstel, R.W., Sappington, K., Wood, W., 2007. Framework for metals risk assessment. Ecotoxicology and Environmental Safety 68, 145–227.
- Graham, M.H., 2003. Confronting multicollinearity in ecological multiple regression. Ecology 84, 2809–2815.
- Grøn, C., Andersen, L., 2003. Human Bioaccessibility of Heavy Metals and PAH from Soil; Environmental project No. 840, Technology Programme for Soil and Groundwater Contamination. Danish Environmental Protection Agency.
- Hamel, S.C., Ellickson, K.M., Lioy, P.J., 1999. The estimation of the bioaccessibility of heavy metals in soils using artificial biofluids by two novel methods: massbalance and soil recapture. Science of the Total Environment 244, 273–283.
- Hund-Rink, K., Kördel, W., 2003. Underlying issues in bioaccessibility and bioavailability: experimental approach methods. Ecotoxicology and Environmental Safety 56, 52–62.
- Juhasz, A.L., Smith, E., Weber, J., Rees, M., Rofe, A., Kuchel, T., Sansom, L., Naidu, R., 2007. Comparison of in vivo and in vitro methodologies for the assessment of arsenic bioavailability in contaminated soils. Chemosphere 69, 961–966.
- Latawiec, A.E., Simmons, P., Reid, B.J., 2010. Decision-makers' perspectives on the use of bioaccessibility for risk-based regulation of contaminated land. Environment International 36, 383–389.
- 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 7, 317–327.
- Ollson, C.A., Koch, I., Smith, P., Knopper, L.D., Hough, C., Reimer, K.J., 2009. Addressing arsenic bioaccessibility in ecological risk assessment: a novel approach to avoid overestimating risk. Environmental Toxicology and Chemistry 28, 668–675.
- Oomen, A.G., Hack, A., Minekus, M., Zeijdner, E., Schoeters, G., Verstraete, W., Wiele, T.V.D., Wragg, J., Rompelberg, C.J.M., Sips, A.J.A.M., Wijnen, J.H.V., 2002. Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. Environmental Science & Technology 36, 3326–3334.
- Paustenbach, D.J., 2000. The practice of exposure assessment: a state of the art review. Journal of Toxicology and Environmental Health B 3, 179–291.
- 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.
- Poggio, L., Vrščaj, B., Schulin, R., Hepperle, E., Marsan, F.A., 2009. Metals pollution and human bioaccessibility of topsoils in Grugliasco (Italy). Environmental Pollution 157, 680–689.
- Rieuwerts, J.S., Thornton, I., Farago, M.E., Ashmore, M.R., 1998. Factors influencing metal bioavailability in soils: preliminary investigation for the development of a critical loads approach for metals. Chemical Speciation and Bioavailability 10, 61–75.
- Roussel, H., Waterlot, C., Pelfrene, A., Pruvot, C., Mazzuca, M., Douay, F., 2010. Cd, Pb and Zn oral bioaccessibility of urban soils contaminated in the past by the atmospheric emissions of two lead and zinc smelters. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 58, 945–954.
- Ruby, M.V., Davis, A., Link, T.E., Schoof, R., Chaney, R.L., Freeman, G.B., Bergstrom, P., 1993. Development of an in vitro screening test to evaluate the in vivo bioaccessibility of ingested mine-waste lead. Environmental Science & Technology 27, 2870–2877.
- 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.
- Ruby, M.V., Schoof, R., Brattin, W., Goldade, M., Post, G., Harnois, M., Mosby, D.E., Casteel, S.W., Berti, W., Carpentier, M., Edwards, D., Cragin, D., 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.
- Ruby, M.V., 2004. Bioavailability of soil-borne chemicals: abiotic assessments tools. Human and Ecological Risk Assessment 10, 647–656.
- Saminathan, S.K.M., Sarkar, D., Andra, S.S., Datta, R., 2010. Lead fractionation and bioaccessibility in contaminated soils with variable chemical properties. Chemical Speciation and Bioavailability 22, 215–225.
- Sipos, P., Németh, T., Mohai, I., Dódony, I., 2005. Effect of soil composition on adsorption of lead as reflected by a study on a natural forest soil profile. Geoderma 124, 363–374.
- Sterckeman, T., Douay, F., Proix, N., Fourrier, H., 2000. Vertical distribution of Cd, Pb and Zn in soils near smelters in the North of France. Environmental Pollution 107, 377–389.
- Sterckeman, T., Douay, F., Proix, N., Fourrier, H., Perdrix, E., 2002. Assessment of the contamination of cultivated soils by eighteen trace elements around smelters in the North of France. Water Air and Soil Pollution 135, 173–194.
- Stevenson, F.J., 1994. Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions, second ed. Wiley, New York.
- 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 A 42, 1203–1211.

- Van Wijnen, J.H., Clausing, P., Brunekreef, B., 1990. Estimated soil ingestion by children. Environmental Research 51, 147–162.
- Waterlot, C., Bidar, G., Pruvot, C., Douay, F., 2011. Analysis of cadmium in water extracts from contaminated soils with high arsenic and iron concentration levels. Journal of Environmental Science and Engineering 5, 271–280.
- Wixson, B.G., Davies, B.E., 1994. Guidelines for lead in soil: proposal of the society of environmental geochemistry and health. Environmental Science & Technology 28, 26–31.
- Wragg, J., Cave, M.R., 2003. In-vitro Methods for the Measurement of the Oral Bioaccessibility of Selected Metals and Metalloids in Soils: A Critical Review. P5–062/TR/01. British Geological Survey, 33 pp.
- Wragg, J., Cave, M.R., Taylor, H., Basta, N., Brandon, E., Casteel, S., et al., 2009. Interlaboratory Trial of a Unified Bioaccessibility Procedure. Open Report OR/ 07/027. British Geological Survey, Keyworth.
 Yang, J.K., Barnett, M.O., Jardine, P.M., Brooks, S.C., 2003. Factors controlling the
- Yang, J.K., Barnett, M.O., Jardine, P.M., Brooks, S.C., 2003. Factors controlling the bioaccessibility of Arsenic(V) and Lead(II) in soil. Soil & Sediment Contamination 12, 165–179.
- Yin, Y., Impellitteri, C.A., You, S.-J., Allen, H.E., 2002. The importance of organic matter distribution and extract soil/solution ratio on the desorption of heavy metals from soils. Science of the Total Environment 287, 101–119.

II.2.4.2. Réponses du modèle établi sur les sols agricoles sur d'autres usages de sols situés sur le site atelier Metaleurop

La méthodologie et les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication [9] insérée ci-dessous.

Pelfrêne A., Waterlot C., Douay F., 2013. Influence of land use on human bioaccessibility of metals in smelter-impacted soils. Environmental Pollution 178, 80-88.

En résumé...

Le modèle établi à partir de données portant sur les sols agricoles a été testé sur 50 échantillons de sols urbains et 50 échantillons de sols boisés. Pour les sols urbains, il permet de prédire avec succès : (1) les concentrations bioaccessibles de Cd et Pb dans la phase G, et ce, quelles que soient les caractéristiques physico-chimiques et les concentrations pseudototales des sols, et (2) les concentrations bioaccessibles en Cd et Pb dans la phase GI et Zn dans les deux phases et ce, pour des sols avec des concentrations pseudototales en Cd, Pb et Zn inférieures à 20, 750 et 2000 mg/kg respectivement. Pour des sols présentant un degré de contamination plus élevé, un facteur correctif (établi à partir des équations des courbes de tendance) doit être appliqué, permettant ainsi d'obtenir une bonne prédiction de la bioaccessibilité orale. Les résultats obtenus sur les sols boisés sont comparables à ceux observés dans le cas des sols urbains. Ainsi, le modèle établi pour les sols agricoles permet donc de prédire avec succès les concentrations bioaccessibles de Cd et Pb dans la phase G, et ce, quelles que soient les caractéristiques physico-chimiques et les concentrations pseudototales des sols urbains. Ainsi, le modèle établi pour les sols agricoles permet donc de prédire avec succès les concentrations bioaccessibles de Cd et Pb dans la phase G, et ce, quelles que soient les caractéristiques physico-chimiques et les concentrations pseudototales des sols boisés. Pour la bioaccessibilité de Cd et Pb dans la phase GI et celle de Zn dans les deux phases, une bonne prédiction de la bioaccessibilité orale nécessibilité orale nécessite d'appliquer un facteur correctif.

La comparaison des réponses du modèle « sols agricoles » avec celles obtenues pour les sols urbains et boisés met en évidence des comportements différents des métaux selon les usages au cours de la digestion gastro-intestinale. Pour expliquer ces différences, des investigations complémentaires sont nécessaires. De plus, le modèle a été établi et validé sur les sols du site atelier Metaleurop. Une des perspectives de ce travail est d'examiner le modèle sur des sols prélevés dans d'autres contextes environnementaux dégradés de la région, voire même à l'échelle nationale.

Environmental Pollution 178 (2013) 80-88

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Environmental Pollution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envpol

Influence of land use on human bioaccessibility of metals in smelter-impacted soils

Aurélie Pelfrêne^{a,b,*}, Christophe Waterlot^{a,b}, Francis Douay^{a,b}

^a Université Lille Nord de France, 59000 Lille, France

^b Groupe ISA, Equipe Sols et Environnement, Laboratoire Génie Civil et géo-Environnement Lille Nord de France (LGCgE), EA 4515, 48 boulevard Vauban, 59046 Lille Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history: Received 6 December 2012 Received in revised form 19 February 2013 Accepted 2 March 2013

Keywords: Metals Contaminated soil Land use Bioaccessibility Model

ABSTRACT

An investigation was undertaken to evaluate the empirical model developed by Pelfrêne et al. (2012), predicting the human bioaccessibility of Cd and Pb in smelter-contaminated agricultural topsoils, by including other soil uses: 50 urban and 65 woody habitat topsoils collected in the same area. The results showed that land use significantly affected the pseudototal metal concentrations and their oral bio-accessibility. However, whatever the soil's physicochemical parameters and degree of contamination, the 'agricultural' model can be used to simulate metal gastric bioaccessibility in urban and woody habitat soils. To simulate gastrointestinal bioaccessibility, this model can be used directly if the pseudototal metal concentrations are on the same order of magnitude as those usually recorded in the agricultural soils studied or after the use of a correction factor if these concentrations are greater. These results showed that the oral bioaccessibility predictions could be applicable for further environmental risk evaluation.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Research on metal oral bioaccessibility relating to contaminatedland management has attracted attention at an international level and has been ongoing for more than 10 years (Basta and Gradwohl, 2000; Hamel et al., 1999; Juhasz et al., 2007; Pelfrêne et al., 2011; Roussel et al., 2010; Ruby et al., 1996; Van de Wiele et al., 2007; Yang et al., 2003). This is an important feature discussed by various authors. Indeed, at a given site, information on metal bioaccessibility (i.e., the fraction of contaminant that is soluble in the gastrointestinal environment and potentially available for absorption; Ruby et al., 1999) to humans, in contrast to total (or pseudototal, defined through the use of aqua regia digestion) contaminant concentrations, offers an effective decision-support tool and an opportunity to better refine contaminant exposure assessments and aid decisionmaking, and can therefore promote a more proportionate and cost-effective assessment of contaminated-land (Alexander, 2000; Brandon et al., 2006; Ollson et al., 2009; Pelfrêne et al., 2012; Wragg and Cave, 2003). One of the more widely accepted in vitro methods for assessing the bioaccessibility of inorganic elements along the oral exposure route, which has been successfully benchmarked

* Corresponding author. E-mail address: aurelie.pelfrene@isa-lille.fr (A. Pelfrêne). against an available in vivo experiment (Denys et al., 2012), was developed by the BioAccessibility Research Group of Europe, providing bioaccessible metal concentrations (Cd, Pb and As) for both the gastric and gastrointestinal phases (Wragg et al., 2011).

Metals are associated with the various components in soils in different ways, and many authors have provided a summary of the main factors that control the bioaccessibility of these metals, e.g., the chemical speciation of the contaminants of concern, soil pH, and the soil contents in organic matter, carbonate minerals, clay, oxides of iron, manganese and aluminum, and phosphorus (Alloway, 1995, 2001; Basta et al., 2005; Caboche et al., 2010; Denys et al., 2007; Fairbrother et al., 2007; Nathanail and McCaffrey, 2003; Pelfrêne et al., 2012; Roussel et al., 2010; Ruby, 2004). Recently, statistical models have been proposed to predict metal bioaccessibility from total (or pseudototal) metal concentrations in soil and various soil properties (Appleton et al., 2012; Caboche et al., 2010; Pelfrêne et al., 2012; Poggio et al., 2009; Roussel et al., 2010). In a previous study (Pelfrêne et al., 2012), we developed a model predicting the oral bioaccessibility of Cd and Pb in agricultural topsoils located in an area highly affected by past atmospheric emissions of two lead and zinc smelters in northern France. An extended database of 390 soil samples was used to elaborate a robust model. As the in vitro tests are quite laborious, having a method by which the human bioaccessible fraction can be estimated from other soil data that are easier to obtain is very







^{0269-7491/\$ –} see front matter @ 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved. http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2013.03.008

advantageous. In Pelfrêne et al. (2012), results were obtained only for agricultural topsoils. Inclusion of other soil uses in this area (e.g., urban soils, woody habitat soils) is needed to: (i) evaluate this empirical model, (ii) compare the contamination levels and physicochemical parameters of these soils located in a similar environmental context, and (iii) better assess the associated potential health risk for local inhabitants. Indeed, this may be of particular importance for human risk assessment because these land uses comprise residential, recreational, or food production areas and are intensively frequented by people.

It is often assumed that urban areas are more contaminated than rural areas due to the high number of the potential sources (Aelion et al., 2008; Douay et al., 2008, 2009; Li et al., 2004; Madrid et al., 2002; Wong et al., 2009). Urban soils were often developed on composite materials and their spatial heterogeneity is a typical feature. Their physicochemical parameters are generally known to be strongly affected by anthropogenic actions, the outcomes of which include compaction of deeper layers, low biodiversity, presence of fragments of various materials and often high concentrations of pollutants. Urban soils, in particular kitchen garden soils, are often subjected to intensive cultural practices and are characterized on average by higher contents of organic matter, total phosphorus, nitrates and nutrients compared to agricultural soils. Land-use change can have significant impacts on soil conditions and could influence the oral bioaccessibility of metals. Moreover, other ecosystems, such as the soils of woody habitats, are less often considered in the literature, even though they are present in the landscape composition. Globally, woody habitats correspond to small groves. woods, poplar groves, anthropogenic linear wooded creations (road embankments, hedges, old railways linked to coal mining, etc.) and forests. The woody habitat features may also influence pollutant deposition and thus local environmental contamination. Ettler et al. (2005) and Mageria and Zawadzki (2007) showed higher metal concentrations in soils of woodlands compared to open lands. Some woody habitat soils, particularly forest areas, presented particular characteristics, such as high organic matter contents (Bergkvist, 2001) and/or soil acidity (Courchesne et al., 2006).

The situation is more complex in industrialized and urban areas such as the North of France where anthropogenic pressures have strongly influenced landscapes and soils (Douay et al., 2008, 2009, 2013). The soils investigated in the present study were sampled from an area of northern France where smelting activities from the latter part of the nineteenth through much of the twentieth century have brought about extensive soil contamination by metals and caused a health risk for the population. Recent studies in this area showed that the patterns and levels of metal contamination differed between agricultural, urban and woody habitat topsoils. Douay et al. (2008, 2009) underlined the very large spatial variability of urban soils and, above all, their high contamination. Douay et al. (2009) and Fritsch et al. (2010) reported that the habitat soils corresponding to hedges showed medium to high anthropization. Soil anthropization was less frequent in groves and woods; conversely, it was low, or even absent for forest land. Therefore, the specificities of the physicochemical parameters of urban and woody habitat soils could lead to oral metal bioaccessibility different from what is observed in agricultural soils. On the area studied, and to our knowledge in the literature, woody habitats are never taken into account in the determination of metal bioaccessibility and in the assessment of population exposure.

The purpose of this study was to evaluate the effects of land uses on the bioaccessibility of metals. Specifically, the study was conducted on both urban and woody habitat soils as follows: (i) determination of Cd and Pb bioaccessibility in the gastric and intestinal phases; and (ii) testing the ability of the model established on agricultural soils to simulate metal bioaccessibility in these soils.

2. Materials and methods

2.1. Sampling sites

The study area is located in the former coal-mining area of northern France where considerable atmospheric emissions of dust were generated by two smelters (the lead smelter Metaleurop Nord at Noyelles-Godault and the zinc smelter Nyrstar at Auby; Fig. 1). These atmospheric discharges highly contaminated the soils around the smelters (Sterckeman et al., 2002; Douay et al., 2008, 2009, 2013).

A 180-km² surface was defined as the study area and 505 topsoil samples were collected surrounding two neighboring smelters (Fig. 1). The locations were classified into three land-use groups: agricultural, urban and woody habitat sites. In Pelfrêne et al. (2012), 390 sites were chosen randomly according to the agricultural land management. In the present study, 50 urban (kitchen gardens and lawns) and 65 woody habitat (hedges, wooded creations, forests, groves) topsoil samples were collected. The sampling sites were chosen in order to represent large-scale metal contamination of soil and to reflect contamination caused by both smelters.

2.2. Characterization of topsoils

The characterization of agricultural topsoils (390 samples) was detailed in Pelfrêne et al. (2012). The same protocols were used to characterize the urban and woody habitat topsoils. In brief, for each site, a composite sample was constituted from the surface layer (0-25 cm). In most situations the vegetative cover and plant roots were not considered part of the surface soil sample and were removed in the field. The soil samples were prepared according to the ISO 11464 standard. The samples were air-dried at a temperature below 40 $^\circ\text{C}$ and crushed to pass through a 2-mm stainless steel sieve. Particle-size distribution was obtained through sedimentation and sieving (NF X 31-107). Soil pH was measured in a water suspension (NF ISO 10390), and organic matter content was obtained by the NF ISO 10694 standard. Total carbonate content was obtained by measuring the volume of CO2 released after a reaction with HCl (NF ISO 10693). Assimilated P (expressed in g P₂O₅ kg⁻¹ of soil) was measured using an extraction by ammonium oxalate solution and spectrocolorimetric determination (NF X 31-161). All these analyzes were performed by the INRA Soil Analysis Laboratory (Arras, France) accredited by COFRAC according to the ISO 17025 standard.

For each of the soil samples, a representative subsample was obtained with an automatic sieve used with an ultracentrifugal mill <250 μ m (Retsch type ZM 200, Germany). The pseudototal element concentrations (Cd, Pb, Fe, Mn, and Al) in the soil subsamples were obtained by Hot Block system-assisted digestion (Environmental Express[®] SC100, Charleston, SC, USA). For this, 300 mg of soil subsamples was digested in a mixture of 1.5 mL nitric acid (70%) and 4.5 mL HCl (37%) (aqua regia). Quality control was based on a certified sample (BCR CRM 141R) and provided good recoveries for Cd, Pb, Zn, and Mn (91–105%, n = 5). For Al and Fe, there are no certified values. However, the recovery for Fe was compared to an indicative value (Waterlot et al., 2011) and was 95%. A single extraction was done with a mix of solutions (0.111 mol L⁻¹ sodium bicarbonate, 0.267 mol L⁻¹ sodium tricitrate, and 200 g L⁻¹ sodium dithionite) to extract free Fe, Mn, and Al oxides (Mehra and Jackson, 1958). The concentrations were measured by atomic absorption spectrometry (AAS, AA-6800, Shimadzu, Japan) using a flame (FAAS).

2.3. In vitro oral bioaccessibility measurement

A total of 505 soil samples within the study's data set (dried and sieved to less than 250 μ m particle-size) were tested by applying the Unified Bioaccessibility Method (UBM; Wragg et al., 2011). The UBM procedure was carried out according to the methodology previously described in full by Roussel et al. (2010), Pelfrêne et al. (2011, 2012), and Wragg et al. (2011). The UBM test consisted in two parallel sequential extractions and provided samples for analysis from both the gastric (G) and gastrointestinal (GI) phases. Although both phases have been shown to be correlated with animal bioavailability (Denys et al., 2012), the G phase gives a more conservative bioaccessible fraction than the GI phase, mainly because of the low pH conditions found in the stomach. For the purposes of the discussion in this paper, the results in both phases were presented, although the gastric phase samples were chosen as being most suitable.

The metal concentrations in the bioaccessibility extracts were measured using FAAS. For every ten soil samples analyzed from the study set, a triplicate soil, a standard control soil (NIST 2710), and a blank were included in the sample batch tested. The values obtained for Cd and Pb in the NIST 2710 reference material (n = 12) were 14.52 \pm 0.56 mg kg⁻¹ and 3969 \pm 293 mg kg⁻¹, respectively, for the G phase, and 7.88 \pm 0.60 mg kg⁻¹ and 1290 \pm 235 mg kg⁻¹, respectively, for the GI phase, and were in good agreement with the current consensus values of 14.80 \pm 1.09 mg kg⁻¹ and 3785 \pm 469 mg kg⁻¹, respectively, for the G phase, and 7.86 \pm 1.81 mg kg⁻¹ and 1138 \pm 910 mg kg⁻¹, respectively, for the GI phase (Wragg et al., 2011).



Fig. 1. Location of the 505 sites sampled in northern France: 390 agricultural soils (from Pelfrêne et al., 2012), 50 urban soils, and 65 woody habitat soils.

2.4. Assessing the performance of the 'agricultural' model

In Pelfrêne et al. (2012), a robust model was established from an extended database of agricultural soils. This model was run using a linear multiple regression to determine the most salient soil parameters for calculating Cd and Pb bioaccessibility in the G and GI phases. In the present study, urban soils (n = 50) and woody habitat soils (n = 65) were considered to evaluate this empirical model.

The mean error (ME), the root mean square error (RMSE), and the coefficient of determination (r_p^2) were calculated from the measured and predicted bioaccessible values in each urban and woody habitat soil sample to compare the accuracy of the predictions and the ability of the 'agricultural' model to simulate metal bioaccessibility:

$$ME = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} (B_i - B_i^*)$$
(1)

RMSE =
$$\left[\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} \left(B_i - B_i^*\right)^2\right]^{1/2}$$
 (2)

$$r_{\rm p}^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{n} \left(B_i^* - B_i\right)^2}{\sum_{i=1}^{n} \left(B_i - \overline{B}\right)^2} \tag{3}$$

where B_i is the measured bioaccessibility at location i, B_i^* is the predicted bioaccessibility at location i, \overline{B} is the mean of the measured values, and n is the sample size. The ME provides a measure of bias; the RMSE provides a measure of accuracy; and r_p^2 expresses the proportion of the original variance accounting for the model predictions. Lower ME and RMSE values indicate fewer errors.

2.5. Statistical analysis

Statistical analyzes were performed using STATISTICA (Statsoft 6.1, Tulsa, OK, USA) or XLSTAT 2010.6.01 (Addinsoft). Multifactor analysis of variance (ANOVA, Tukey test) was used and a probability level of p < 0.05 was chosen to establish statistical significance.

3. Results and discussion

3.1. General properties of the soils

The soils around the former Metaleurop Nord smelter developed mainly on loessic materials, while those around Nyrstar originated from alluvial deposits characterized by a large textural variability (Sterckeman et al., 2000). The main physicochemical parameters of the sampled soils are presented in Table 1. On average the surface layers of the soils studied showed mainly a loamy texture that was sometimes carbonated. However, the clay and more particularly the sand contents varied considerably. For all soil samples studied in this area, the physicochemical parameters showed relatively high variability, highlighting the wide heterogeneity of the soils. High variability was also observed within a single soil use.

On average the results showed that: (i) urban and woody habitat soils presented higher carbonate, organic matter, and free Fe-, Mn-, Al-oxide contents, and higher concentrations of Cd and Pb than agricultural soils; (ii) the contents of assimilated P in soils were in the following order: urban > agricultural > woody habitat soils; (iii) the soil pH values in agricultural and urban soils were significantly higher than that of woody habitat soils, and there was no significant difference between agricultural and urban soils. For most parameters, the median and mean values were quite similar, except for carbonate and organic matter contents, where values were significantly different (Table 1). The wide pH range of agricultural soils reflected the influence of cultural practices. Thus, liming could result in a neutral or even slightly basic pH for ploughed soils. The high pH values of urban soils could be partly explained by extraneous materials such as bricks and construction

Table 1	
Statistical values of physicochemical parameters and pseudototal concentrations of metals in the topsoils in different land-use patterns.	

		Agricultur	al soils ^a ($n = 39$	0)	Urban soil	s (n = 50)		Woody ha	Woody habitat soils ($n = 65$)		
		Mean	Median	SD	Mean	Median	SD	Mean	Median	SD	
Clay	g kg ⁻¹	198a	181	67	206a,b	210	47	223b	221	73	
Silt	g kg ⁻¹	537a	548	161	532a,b	532	100	479b	489	112	
Sand	g kg ⁻¹	266a	209	176	262a	238	112	298a	287	146	
pH water		7.7a	7.9	0.7	7.4a	7.5	0.5	7.0b	7.4	1.2	
Total CaCO ₃	g kg ⁻¹	14a	3.0	36	29b	12	33	31b	6.1	41	
Organic matter	$g kg^{-1}$	38a	31	20	50b	81	28	91b	79	62	
Assimilated P	g kg ⁻¹	0.425a	0.390	0.244	0.782b	0.633	0.625	0.231c	0.203	0.280	
Free Fe oxide	$g kg^{-1}$	3.26a	2.56	3.36	3.30a,b	3.48	1.20	4.51b	4.79	2.32	
Free Mn oxide	$g kg^{-1}$	0.24a	0.24	0.10	0.20b	0.19	0.07	0.17b	0.15	0.11	
Free Al oxide	g kg ⁻¹	0.32a	0.25	0.19	0.43b	0.40	0.18	0.50b	0.42	0.28	
Pseudototal Fe	g kg ⁻¹	22.09a	19.23	10.94	17.05b	17.33	3.28	16.48b	15.78	5.12	
Pseudototal Mn	g kg ⁻¹	0.37a	0.36	0.14	0.35a,b	0.33	0.10	0.30b	0.27	0.17	
Pseudototal Al	$g kg^{-1}$	9.08a	7.77	6.36	7.94a	7.93	1.56	7.67a	7.40	1.80	
Pseudototal Cd	mg kg ⁻¹	3.5a	2.8	2.3	12.1b	10.3	7.8	10.4b	6.4	10.3	
Pseudototal Pb	mg kg $^{-1}$	153a	115	116	761b	575	631	555c	366	589	

Mean values followed by alphabetical letters (a, b, and c) denote a difference (ANOVA, p < 0.05) between land uses.

^a From Pelfrêne et al. (2012).

debris included in the soil (Biasioli et al., 2006), but also by cultural practices in kitchen gardens (e.g., liming). For woody habitat soils, topsoil pH can vary greatly (ranging from 4.1 to 8.2). Even if they were often neutral, they might be locally acidic (in particular for forest habitats and agricultural hedges) or basic.

Compared to agricultural soils, urban and woody habitat soils presented particular characteristics (e.g., high variability of pH, carbonate and organic matter contents) resulting from high anthropogenic pressure. This has already been reported by several authors (Aelion et al., 2008: Davis et al., 2009: Douav et al., 2008: Li et al., 2004; Madrid et al., 2002). Indeed, urban soils presented unpredictable layering due especially to the mixing and incorporation of slag, ashes, waste, building rubble, tar, sludge, coal burning waste, etc. Many activities may disturb contaminant concentrations, such as lawn moving and maintenance, gardening, leisure activities, vehicular traffic, urban heating, addition of materials to improve soil texture, corrosion of building materials, etc. The degree of contamination of woody habitat soils was significantly higher than that of agricultural soils. Previous studies have provided evidence for the substantial anthropogenic reworking of these soils (Douay et al., 2009; Fritsch et al., 2010). They also highlighted that the degree of metal contamination in forest topsoils was two or three times greater than that in the surrounding agricultural soils, which could be explained by the foliar uptake and the canopy filtration of dust, aerosols and gases. Nevertheless, decomposition of contaminated leaves as well as of twigs and barks progressively caused an increase in soil pollutant concentrations.

3.2. Influence of land use on Cd and Pb bioaccessibility

In vitro bioaccessibility of Cd and Pb measured in the 390 agricultural soil samples ranged, respectively: (i) from 0.4 to

13.6 mg kg⁻¹ and from 13 to 568 mg kg⁻¹ of soil for the G phase, and (ii) from 0.1 to 5.5 mg kg⁻¹ and from 2 to 172 mg kg⁻¹ of soil for the GI phase (Table 2; from Pelfrêne et al., 2012). For the 50 urban soil samples, the bioaccessible values of Cd and Pb ranged, respectively: (i) from 2.0 to 24.7 mg kg⁻¹ and from 62 to 1879 mg kg^{-1} for the G phase, and (ii) from 0.6 to 16.0 mg kg^{-1} and from 20 to 1136 mg kg⁻¹ for the GI phase (Table 2). For the 65 woody habitat soils, the bioaccessible concentrations of Cd and Pb ranged, respectively: (i) from 0.3 to 43.6 mg kg^{-1} and from 41 to 2126 mg kg⁻¹ for the G phase, and (ii) from 0.2 to 22.0 mg kg⁻¹ and from 8 to 640 mg kg⁻¹ for the GI phase (Table 2). The histograms and summary statistics of Cd and Pb bioaccessibility (expressed as a percentage of pseudototal concentrations) in soils are shown in Fig. 2. For all soil uses: (i) the coefficients of variation (CVs) ranged from 13.6 to 52.6%, (ii) bioaccessible fractions of Cd and Pb in the G phase showed relatively low variability with CVs less than 20%, and (iii) the CVs in the GI phase exceeded 20%, indicating considerable variability of bioaccessible concentrations in the area studied. The UBM test produced two results: the first mimicking the conditions found in the highly acidic environment of the stomach in a fasting state (pH 1.2-1.7), and the second mimicking the upper intestine with a higher pH (6.3 \pm 0.5). In the latter phase, the higher pH can often lead to precipitation of elements giving rise to poorer reproducibility than the stomach phase extract (Pelfrêne et al., 2011; Roussel et al., 2010; Wragg et al., 2011).

The results showed that land use significantly affected the bioaccessible concentrations of Cd and Pb (ANOVA, Tukey test, p < 0.05). In the G phase, the mean values of the bioaccessible fraction of Cd were significantly lower in the urban soils (68.0%) than in the woody habitat (75.0%) and agricultural (77.3%) soils, whereas Pb mean values were significantly higher in the woody habitat soils (65.3%) than in the urban (59.8%) and agricultural

 Table 2

 Statistical values of bioaccessible concentrations of metals (in the gastric [G] and gastrointestinal [GI] phases) in the topsoils in different land-use patterns.

		Agricultural so	oils ^a (n = 390)		Urban soils (r	a = 50)		Woody habita	t soils ($n = 65$)	
		Range	Mean	SD	Range	Mean	SD	Range	Mean	SD
Cd G	mg kg ⁻¹	0.4-13.6	2.7	1.8	2.0-24.7	8.1	5.5	0.3-46.3	8	8.5
Cd GI	mg kg ⁻¹	0.1-5.5	1.5	0.9	0.6-16.0	4	3.2	0.2-22.0	3.4	3.9
Pb G	mg kg ⁻¹	13-568	90	76	62-1879	462	405	41-2126	361	393
Pb GI	${ m mg}~{ m kg}^{-1}$	2-172	31	27	20-1136	216	266	8-640	131	122

^a From Pelfrêne et al. (2012).



(57.6%) soils (Fig. 2). Woody habitats have never been taken into account in health risk assessment in such a comprehensive way. The very high contamination of these soils and their high bioaccessibility might noticeably increase exposure of the population. In the GI phase, the mean values of the bioaccessible fraction of Cd were significantly higher in the agricultural soils (46.2%) than in the woody habitat (31%) and urban (32%) soils, whereas those of Pb were lower in the agricultural soils (20.8%) than in the woody habitat (24.6%) and urban (24.4%) soils (Fig. 2).

Within a soil use, a high variability of bioaccessible fraction was recorded. This result suggests that the soil feature, the habitat type, or the cultural practices influenced the physicochemical parameters of soils, the pseudototal metal concentration, and metal bioaccessibility. In their study on woody habitat soils of the area studied, Fritsch et al. (2010) reported higher CaCl₂-extracted metal concentrations for the forest habitats and agricultural hedges than for the other habitat types, and explained this result by the acidic soil pH. However, in the present study, the acidic pH recorded in some woody habitat soils did not affect the bioaccessibility of metals because the pH values of the soil–digestive solution mix were adjusted in the UBM test at 1.50 \pm 0.05 in the G phase and 6.3 \pm 0.5 in the GI phase.

Agricultural topsoils showed higher Cd bioaccessibility than urban and woody habitat soils. This result suggests higher environmental availability of Cd in agricultural soils compared to other land uses. This could be most likely due to the different forms in which Cd was bound to the soil constituents (e.g., carbonates, Fe/ Mn oxides) and that could be significantly depleted by in vitro gastrointestinal extraction treatment (Pelfrêne et al., 2011). The lowest Cd bioaccessibility in urban and woody habitat topsoils could be attributed to the presence of more stable complexes, e.g. with organic matter.

Urban and woody habitat soils, characterized by high organic matter and carbonate contents, showed higher Pb bioaccessibility than agricultural soils. This result was not in agreement with those of Saminathan et al. (2010) and Tang et al. (2008), who reported high Pb bioaccessibility in soils having a low organic matter content. In the present study, the high Pb bioaccessibility recorded in urban and woody habitat soils suggests an association of Pb with other soil constituents (e.g., carbonates, Fe/Mn oxides) more labile to the UBM extraction (Madrid et al., 2008; Pelfrêne et al., 2011). Denys et al. (2007) providing evidence that, in highly carbonated soils, Pb might be strongly associated with carbonates and therefore strongly bioaccessible to humans in the highly acidic environment of the stomach. Other Pb-bearing minerals can also play a significant role in overall Pb bioaccessibility. The lowest Pb bioaccessibility in agricultural soils could be attributed to the presence of more stable Pb minerals (e.g., sulfate and phosphate phases), insoluble in the acidic conditions of the UBM extraction (Porter et al., 2004; Ruby et al., 1999).

The differences in metal bioaccessibility observed in the soils according to land use could also be explained by the metal—ligand ratio in digestive juices. In urban and woody habitat soils, where metal concentrations were high, the ligand-binding sites could be quickly saturated by metals, resulting in an increase or decrease in the oral bioaccessibility of Cd and Pb. Moreover, metals could be competing with available binding sites on soil constituents and/or chyme constituents.

3.3. Assessing the performance of the 'agricultural' model on urban and woody habitat soils

In Pelfrêne et al. (2012), an investigation was undertaken to identify the most significant soil parameters that can be used to



Fig. 3. Measured bioaccessibility versus predicted bioaccessibility of Cd and Pb (in the gastric [G] and the gastrointestinal [GI] phases) for assessing the performance of the 'agricultural' model on urban soils. The dotted line describes a perfect match between measured and predicted values (1:1).

predict Cd and Pb bioaccessibility in agricultural soils. Total carbonate, organic matter, assimilated P, free Fe oxide and pseudototal Al, Cd and Pb contents appeared as the main variables governing metal bioaccessibility. The present approach consisted in evaluating the resulting 'agricultural' models on 50 urban and 65 woody habitat soil samples (Figs. 3 and 4). The agreement between the measured and model-predicted bioaccessibility was quantified with the RMSE, ME, and r_p^2 values (Table 3).

For urban and woody habitat soils, results in the G phase showed that: (i) the 'agricultural' models can predict Cd and Pb bioaccessibility quite successfully, with r_p^2 greater than 0.90; (ii) bioaccessibility in woody habitat soils had the highest prediction accuracy ($r_p^2 = 0.98$ and 0.97 for Cd and Pb, respectively); (iii) the regression lines between measured and predicted values were all close to the 1:1 line; (iv) the RMSE and the ME values for these models were low, suggesting a satisfactory and effective ability of the 'agricultural' model to simulate metal gastric bioaccessibility. For human health risk assessment, even if the metal bioaccessible fraction in the GI phase is more physiologically relevant, those in the G phase would provide a more conservative assessment (Appleton et al., 2012; Barsby et al., 2012; Caboche et al., 2010; Pelfrêne et al., 2011, 2012). On the area studied, the results showed that the 'agricultural' model can be used to simulate metal gastric bioaccessibility in urban and woody habitat soils whatever their physicochemical parameters, their contamination degree, their contamination source or their features may be.

In the GI phase, metal bioaccessibility in urban and woody habitat soils presented a different behavior and the results showed that: (i) even though the prediction results were poor (high RMSE and ME values, and low r_p^2 ; Table 3), strong linear relationships between the measured and predicted values existed (R^2 values greater than 0.80; Figs. 3 and 4); (ii) the regression lines deviated substantially from the 1:1 line; (iii) Figs. 3 and 4 indicate that the lowest bioaccessibility values were well distributed around the regression line, whereas the predicted high bioaccessible concentrations were underestimated. Examination of these patterns revealed that the differences observed between predicted and measured values could not be attributed to either the physicochemical parameters of soils or the soil features (lawns, kitchen gardens, hedges, wooded creations, forests, or groves) or to the influence of the contamination source (Metaleurop Nord or Nyrstar). Sterckeman et al. (2002) showed that the degree of contamination of soils surrounding the smelters was slightly different depending on the source. In the present study, the patterns observed were only linked to the presence of higher pseudototal metal concentrations in urban and woody habitat soils compared to those in agricultural soils. Indeed, the pseudototal concentrations of Cd and Pb ranged, respectively, from 0.9 to 15.0 mg kg⁻¹ and from 42 to 854 kg⁻¹ in agricultural soils, from 3.1 to 31.4 kg⁻¹ and from 95 to 3026 kg⁻¹ in urban soils, and from 0.4 to 51.0 kg⁻¹ and from 73 to 3392 kg⁻¹ in woody habitat soils (Table 1). The differences observed between predicted and measured bioaccessible values in the GI phase were recorded when pseudototal concentrations were greater than: (i) 17 mg kg⁻¹ for Cd and 790 mg kg⁻¹ for Pb in urban



Fig. 4. Measured bioaccessibility versus predicted bioaccessibility of Cd and Pb (in the gastric [G] and the gastrointestinal [GI] phases) for evaluation of the performance of the 'agricultural' model on woody habitat soils. The dotted line describes a perfect match between measured and predicted values (1:1).

soils, and (ii) 18 mg kg⁻¹ for Cd and 600 mg kg⁻¹ for Pb in woody habitat soils. Because strong linear relationships between the measured and predicted values existed, the 'agricultural' model can also be used to simulate high metal bioaccessible concentrations by adding a correction factor to the predicted value. This factor can be determined from the regression equation (Figs. 3 and 4). The results in the GI phase show that the 'agricultural' model can be used to simulate metal bioaccessibility in urban and woody habitat soils: (i) directly if the pseudototal metal concentrations were on the same order of magnitude as those usually recorded in agricultural soils, and (ii) after use of a correction factor obtained from the regression equation if these concentrations were greater.

Table 3 Values of statistical parameters for model evaluation on urban and woody habitat soils.

	Cd G	Cd GI	Pb G	Pb GI
Urban soils				
$r_{\rm p}^2$	0.90	0.84	0.95	0.58
$ {RMSE}$ (mg kg ⁻¹)	1.76	1.26	90.78	171.00
$ME (mg kg^{-1})$	-0.97	0.32	-7.50	65.30
Woody habitat soils				
r_p^2	0.98	0.81	0.97	0.74
RMSE (mg kg ⁻¹)	1.32	1.67	68.41	62.12
$ME (mg kg^{-1})$	0.19	0.21	26.41	35.06

 $r_{\rm p}^2$, coefficient of determination; RMSE, root mean square error; ME, mean error.

4. Conclusions

In a previous study (Pelfrêne et al., 2012), we developed a robust model from an extended database of 390 soil samples predicting the oral bioaccessibility of Cd and Pb in agricultural topsoils located in an area highly affected by the past atmospheric emissions of two Pb and Zn smelters in northern France. In the present study, an investigation was undertaken to evaluate this empirical model by including other soil uses (urban and woody habitat soils) collected in this area.

Compared to agricultural soils, urban and woody habitat soils presented particular characteristics resulting from high anthropogenic pressure. The specificities of the physicochemical parameters of urban and woody habitat soils also generated metal bioaccessibility different from what was observed in agricultural soils. Agricultural soils, characterized by low organic matter and carbonate contents, showed a higher Cd bioaccessibility than the other soils. Urban and woody habitat soils, characterized by high organic matter and carbonate contents, on average showed higher Pb bioaccessibility than agricultural soils. This result may be of particular importance for human risk assessment since these land uses: (i) constitute residential, recreational, or food production areas, (ii) are intensively frequented by people, and (iii) could contribute significantly to the population's exposure to lead in this area where the mean blood Pb level in children still remains higher than the French average. The differences observed between the three types of land use suggest that the bioaccessibility of Cd and Pb was affected by soil physicochemical parameters, metal speciation, and pseudototal metal concentrations.

Even if the land use has significantly affected the pseudototal concentrations and the bioaccessibility of Cd and Pb, the model established from agricultural soils can be used to simulate the metal gastric bioaccessibility in urban and woody habitat soils collected in the area studied for all physicochemical parameters, contamination levels, contamination sources (around Metaleurop Nord or Nyrstar) and plot features (lawns, kitchen gardens, hedges, wooded creations, forests, or groves). To simulate the GI phase, the 'agricultural' model can be used directly if the pseudototal metal concentrations were on the same order of magnitude as those usually recorded in agricultural soils, or after use of a correction factor from the regression equation if these concentrations were greater. These results show that the bioaccessibility predictions could be applicable for further risk evaluation on the area studied. Even if the metal bioaccessible fraction in the GI phase is more physiologically relevant, those in the G phase would provide a more conservative assessment for human health risk assessment.

The inclusion of bioaccessible concentrations in the woody habitats in risk estimations could give more realistic information for health risk assessment and will be taken into account in a further investigation. Moreover, the results were obtained for soils with different land-use conditions sampled in the area studied in northern France. It is necessary to confirm the relationships between physicochemical soil parameters and human bioaccessibility obtained with the robust 'agricultural' model by carrying out a similar investigation in other areas.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Nord-Pas de Calais Council and ADEME for their financial support of this research as part of the BIOMIS and BIOAC programs. We are grateful to all the members who have participated in these programs for their valuable scientific contributions.

References

- Aelion, C.M., Davis, H.T., McDermott, S., Lawson, A.B., 2008. Metal concentrations in rural topsoil in South Carolina: potential for human health impact. Science of the Total Environment 402. 149–156.
- Alexander, M., 2000. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. Environmental Science & Technology 34, 4259–4265.
- Alloway, B.J. (Ed.), 1995. Heavy Metals in Soils, second ed. Blackie Academic & Professional, Glasgow.
- Alloway, B.J., 2001. Soil pollution and land contamination. In: Harrison, R.M. (Ed.), Pollution: Causes, Effects and Control, fourth ed. Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 352–377.
- 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.
- 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.
- Basta, N., Gradwohl, R., 2000. Estimation of Cd, Pb, and Zn bioavailability in smeltercontaminated soils by a sequential extraction procedure. Journal of Soil Contamination 9, 149–164.
- Basta, N.T., Ryan, J.A., Chaney, R.L., 2005. Trace element chemistry in residualtreated soil: key concepts and metal bioavailability. Journal of Environmental Quality 34, 49–63.
- Bergkvist, B., 2001. Changing of lead and cadmium pools of Swedish forest soils. Water, Air, and Soil Pollution 1, 371–383.
- Biasioli, M., Barberis, R., Ajmone-Marsan, F., 2006. The influence of a large city on some soil properties and metals content. Science of the Total Environment 356, 154–164.
- Brandon, E.F.A., Oomen, A.G., Rompelberg, C.J.M., Versantvoort, C.H.M., van Engelen, J.G.M., Sips, A.J.A.M., 2006. Consumer product in vitro digestion model: bioaccessibility of contaminants and its application in risk assessment. Regulatory Toxicology and Pharmacology 44, 161–171.Caboche, J., Denys, S., Feidt, C., Delalain, P., Tack, K., Rychen, G., 2010. Modelling Pb
- 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.
- Courchesne, F., Kruyts, N., Legrand, P., 2006. Labile zinc concentration and free copper ion activity in the rhizosphere of forest soils. Environmental Toxicology and Chemistry 25, 635–642.

- Davis, H.T., Aelion, C.M., McDermott, S., Lawson, A.B., 2009. Identifying natural and anthropogenic sources of metals in urban and rural soils using GIS-based data, PCA, and spatial interpolation. Environmental Pollution 157, 2378–2385.
- Denys, S., Caboche, J., Tack, K., Delalain, P., 2007. Bioaccessibility of lead in high carbonate soils. Journal of Environmental Science and Health A 42, 1331–1339.
- 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.
- Douay, F., Pruvot, C., Roussel, H., Ciesielski, H., Fourrier, H., Proix, N., Waterlot, C., 2008. Contamination of urban soils in an area of northern France polluted by dust emissions of two smelters. Water, Air, and Soil Pollution 188, 247–260.
- Douay, F., Pruvot, C., Waterlot, C., Fritsch, C., Fourrier, H., Loriette, A., Bidar, G., Grand, C., de Vaufleury, A., Scheiffler, R., 2009. Contamination of woody habitat soils around a former lead smelter in the North of France. Science of the Total Environment 407, 5564–5577.
- Douay, F., Pelfrêne, A., Planque, J., Fourrier, H., Richard, A., Roussel, H., Girondelot, B., 2013. Assessment of potential health risk for inhabitants living near a former lead smelter. Part 1: metal concentrations in soils, agricultural crops, and homegrown vegetables. Environmental Monitoring and Assessment. http:// dx.doi.org/10.1007/s10661-012-2818-3.
- Ettler, V., Vanek, A., Mihaljevic, M., Bezdicka, P., 2005. Contrasting lead speciation in forest and tilled soils heavily polluted by lead metallurgy. Chemosphere 58, 1449–1459.
- Fairbrother, A., Wenstel, R.W., Sappington, K., Wood, W., 2007. Framework for metals risk assessment. Ecotoxicology and Environmental Safety 68, 145–227.
- Fritsch, C., Giraudoux, P., Coeurdassier, M., Douay, F., Raoul, F., Pruvot, C., Waterlot, C., de Vaufleury, A., Scheifler, R., 2010. Spatial distribution of metals in smelter-impacted soils of woody habitats: Influence of landscape and soil properties, and risk for wildlife. Chemosphere 81, 141–155.
- Hamel, S.C., Ellickson, K.M., Lioy, P.J., 1999. The estimation of the bioaccessibility of heavy metals in soils using artificial biofluids by two novel methods: massbalance and soil recapture. Science of the Total Environment 244, 273–283.
- Juhasz, A.L., Smith, E., Weber, J., Rees, M., Rofe, A., Kuchel, T., Sansom, L., Naidu, R., 2007. Comparison of in vivo and in vitro methodologies for the assessment of arsenic bioavailability in contaminated soils. Chemosphere 69, 961–966.
- Li, X., Lee, S., Wong, S., Shi, W., Thornton, I., 2004. The study of metal contamination in urban soils of Hong Kong using a GIS-based approach. Environmental Pollution 129, 113–124.
- Madrid, L., Diaz-Barrientos, E., Madrid, F., 2002. Distribution of heavy metal contents of urban soils in parks of Seville. Chemosphere 49, 1301–1308.
- 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, 21–32.
- Mageria, T., Zawadzki, J., 2007. Using a high-resolution topsoil magnetic screening for assessment of dust deposition: comparison of forest and arable soil datasets. Environmental Monitoring and Assessment 125, 19–28.
- Mehra, O.P., Jackson, M.L., 1958. Iron oxide removal from soils and clays by a dithionite-citrate system buffered with sodium bicarbonate. Clays and Clay Minerals 7, 317–327.
- Nathanail, C.P., McCaffrey, C., 2003. The use of oral bioaccessibility in assessment of risks to human health from contaminated land. Land Contamination & Reclamation 11, 309–313.
- Ollson, C.A., Koch, I., Smith, P., Knopper, L.D., Hough, C., Reimer, K.J., 2009. Addressing arsenic bioaccessibility in ecological risk assessment: a novel approach to avoid overestimating risk. Environmental Toxicology and Chemistry 28, 668–675.
- 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.
- 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.
- Poggio, L., Vrščaj, B., Schulin, R., Hepperle, E., Marsan, F.A., 2009. Metals pollution and human bioaccessibility of topsoils in Grugliasco (Italy). Environmental Pollution 157, 680–689.
- Porter, S.K., Scheckel, K.G., Impellitteri, C.A., Ryan, J.A., 2004. Toxic metals in the environment: thermodynamic considerations for possible immobilization strategies for Pb, Cd, As, and Hg. Critical Reviews in Environmental Science and Technology 6, 495–604.
- 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 the atmospheric emissions of two lead and zinc smelters. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 58, 945–954.
- 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.
- 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.
- Ruby, M.V., 2004. Bioavailability of soil-borne chemicals: abiotic assessments tools. Human and Ecological Risk Assessment 10, 647–656.

- Saminathan, S.K.M., Sarkar, D., Andra, S.S., Datta, R., 2010. Lead fractionation and bioaccessibility in contaminated soils with variable chemical properties. Chemical Speciation and Bioavailability 22, 215–225.
- Sterckeman, T., Douay, F., Proix, N., Fourrier, H., 2000. Vertical distribution of Cd, Pb and Zn in soils near smelters in the North of France. Environmental Pollution 107, 377–389.
- Sterckeman, T., Douay, F., Proix, N., Fourrier, H., Perdrix, E., 2002. Assessment of the contamination of cultivated soils by eighteen trace elements around smelters in the North of France. Water, Air, and Soil Pollution 135, 173–194.
- Tang, X.Y., Cui, Y.S., Duan, J., Tang, L., 2008. Pilot study of temporal variations in lead bioaccessibility and chemical fractionation in some Chinese soils. Journal of Hazardous Materials 160, 29–36.
- 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 A 42, 1203–1211.
- Waterlot, C., Bidar, G., Pruvot, C., Douay, F., 2011. Analysis of cadmium in water extracts from contaminated soils with high arsenic and iron concentration levels. Journal of Environmental Science and Engineering 5, 271–280.
- Wong, F., Robson, M., Diamond, M.L., Harrad, S., Truong, J., 2009. Concentrations and chiral signatures of POPs in soils and sediments: a comparative urban versus rural study in Canada and UK. Chemosphere 74, 404–411.
- Wragg, J., Cave, M.R., 2003. In-vitro Methods for the Measurement of the Oral Bioaccessibility of Selected Metals and Metalloids in Soils: A Critical Review. P5-062/TR/01. British Geological Survey, 33 pp.
- OG2/TR/O1. British Geological Survey, 33 pp.
 Wragg, J., Cave, M.R., Basta, N., Brandon, E., Casteel, S.E.B., Denys, S., Grøn, 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.
- Yang, J.K., Barnett, M.O., Jardine, P.M., Brooks, S.C., 2003. Factors controlling the bioaccessibility of Arsenic(V) and Lead(II) in soil. Soil & Sediment Contamination 12, 165–179.

II.2.5. Influence du mode de gestion du sol sur la bioaccessibilité orale

Dans une démarche de gestion des sites pollués, le phytomanagement peut limiter les risques environnementaux et sanitaires tout en permettant aux sols d'assurer des services écosystémiques. Depuis plusieurs années, le LGCgE-ISA Lille travaille sur le phytomanagement des sols agricoles situés aux alentours de l'ancienne fonderie Metaleurop Nord qui repose plus particulièrement sur le développement de deux filières de biomasses végétales : des essences arborées (robinier, aulne, chêne, érable) et une graminée vivace (*Miscanthus x giganteus*). Un des volets de cette étude concerne les implications sanitaires liées au mode de gestion proposé. En vue de mieux évaluer les dangers sanitaires en lien avec l'ingestion de particules de sols contaminés, j'ai déterminé la bioaccessibilité orale de Cd et Pb dans les sols collectés avant et après la mise en œuvre de ce mode de gestion **[7, 27]**. Il est fait l'hypothèse que la bioaccessibilité des métaux pourrait évoluer au cours du temps en relation avec une modification de la spéciation des polluants résultant de changements de certains paramètres physico-chimiques de sols requalifiés.

II.2.5.1. Dispositifs expérimentaux

Les parcelles étudiées sont situées sur le site atelier Metaleurop dans un même contexte environnemental et présentent un fort degré de contamination en métaux des sols ($15,8 \pm 1,8$ mg/kg pour Cd et 886 ± 130 mg/kg pour Pb). Historiquement, il s'agit de parcelles agricoles qui ont été requalifiées en 2000 pour les parcelles boisées (nommées R, F1 et F2) et en 2010 pour la parcelle de miscanthus (MV) (Figure II.5).



Figure II.5. A – Dispositifs expérimentaux comprenant les parcelles boisées R, F1 et F2 et la parcelle de miscanthus MV ; B1 et B2 – Vues de la parcelle MV ; C – Vue des parcelles boisées [27]

La filière bois a impliqué différentes essences (aulne, érable, robinier, saule) et un traitement préalable des sols des parcelles F1et F2 au moyen de deux types de cendres volantes issues de centrales thermiques équipée de chaudières à lit fluidisé circulant (respectivement une cendre alumino-silicatée et une cendre sulfo-calcique). Il a été montré que l'amendement des sols permet de réduire la mobilité et la phytodisponibilité de Cd, Pb et Zn (Lopareva-Pohu et al., 2011 ; Pourrut et al., 2011).

Sur la parcelle MV, il a été planté des plants de *Miscanthus x giganteus* ayant trois origines distinctes (nommées A, B et I).

Des échantillons de terre ont été collectés dans l'horizon organo-minéral (0 - 25 cm) des sols des différentes parcelles, caractérisant ainsi différents usages de ces sols :

- 1) un usage agricole avant la mise en œuvre du phytomanagement : prélèvement de 18 échantillons sur la parcelle MV ;
- 2) la parcelle de miscanthus : prélèvement de 18 échantillons représentatifs des différentes origines des plants, trois ans après la mise en place des dispositifs ;
- 3) les parcelles boisées avec ou sans amendement des sols : prélèvements de 9 échantillons (3 sur chaque parcelle), onze ans après la mise en place des dispositifs.

II.2.5.2. Evaluation des effets des modes de phytomanagement étudiés sur la bioaccessibilité orale de Cd et Pb

Avant leur plantation (Figure II.6), les sols présentent de fortes concentrations bioaccessibles en Cd et Pb dans la phase G (79 et 77%, respectivement) qui diminuent de manière significative dans la phase GI (41 et 32%, respectivement), ce qui indique qu'une part importante de la concentration totale des métaux n'est pas disponible en cas d'ingestion de particules de sols contaminés.



Figure II.6. Concentrations bioaccessibles de Cd et Pb dans les phases G et GI des sols dans les différentes parcelles. Les lettres (a, b dans la phase G et A, B dans la phase GI) notent des différences significatives entre les plants de miscanthus selon leurs origines et entre les différentes parcelles boisées ; *note des différences significatives entre les sols avant et après plantation (Test de Tukey, ANOVA, *p* < 0,05) [27]

Trois ans après la mise en place des différentes modalités sur la parcelle MV, les résultats sont les suivants (Figure II.6) :

- la bioaccessibilité de Cd et Pb dans la phase G a significativement augmenté pour le génotype A (de 13% pour Cd et 10% pour Pb), tandis qu'il n'y a pas de différence significative pour les autres plants de miscanthus ;
- pas de différence significative de la bioaccessibilité de Cd dans la phase GI, avec cependant une concentration bioaccessible légèrement plus faible pour le miscanthus d'origine I (37%);
- la bioaccessibilité de Pb dans la phase GI a significativement diminué quelle que soit l'origine des plants de miscanthus.

Ces résultats suggèrent peu d'influence à court terme du mode de gestion proposé sur la bioaccessibilité orale de Cd dans les phases G et GI et celle de Pb dans la phase G. Néanmoins, dans la phase GI, la bioaccessibilité de Pb se trouve fortement réduite sans observer de différences significatives entre les trois origines de miscanthus étudiées.

Onze ans après la mise en place des parcelles R, F1 et F2, le boisement des trois parcelles couplé à l'utilisation de deux amendements minéraux sur F1 et F2 montrent les résultats suivants (Figure II.6) :

- la bioaccessibilité de Cd et Pb dans la phase G a significativement augmenté pour l'ensemble des dispositifs (en moyenne de 6% pour Cd et de 10% pour Pb) ;
- la bioaccessibilité de Cd a également significativement augmenté dans la phase GI pour les trois parcelles (de 8% en moyenne) ;
- pas de différence significative de la bioaccessibilité de Pb dans la phase GI pour les parcelles R et F1, tandis qu'une importante diminution est observée dans la parcelle F2 (de 18% en moyenne).

Ces résultats suggèrent une forte influence à moyen terme du mode de gestion proposé avec l'augmentation de la bioaccessibilité orale de Cd dans les phases G et GI et celle de Pb dans la phase G. Néanmoins, dans la phase GI, la bioaccessibilité de Pb se trouve fortement réduite pour la parcelle F2.

Les variations observées peuvent s'expliquer par l'évolution de certains paramètres physico-chimiques des sols (e.g. diminution du pH, augmentation des teneurs en matières organiques, diminution des teneurs en fer). Les complexes formés entre les métaux et les différents constituants du sol se trouvent alors plus ou moins bioaccessibles au regard des conditions chimiques des extractions (phases G et/ou GI).

Bilan : Quel que soit le mode de gestion envisagé, une très forte bioaccessibilité des métaux est observée dans la phase G (> 75%), qui diminue de manière significative dans la phase GI (< 50%). Les modes de gestion proposés ne permettent pas de diminuer la bioaccessibilité orale de Cd et Pb dans la phase G. Dans la phase GI, qui d'un point de vue physiologique correspond à la phase la plus pertinente, la bioaccessibilité de Cd n'est pas diminuée. En revanche, le phytomanagement assisté combinant un amendement de cendres sulfo-calciques et une végétation arborée permet de réduire de façon significative la bioaccessibilité orale pour l'homme de Pb. Il en est de même avec Miscanthus x giganteus.

II.3. Bioaccessibilité orale des métaux dans les légumes autoproduits

II.3.1. Diagnostic de la contamination des productions sur le secteur d'étude

Des recherches réalisées depuis près de 20 ans à proximité de sites métallurgiques du Nord – Pas de Calais ont mis en évidence une forte contamination en Cd, en Pb et en Zn des sols urbains et notamment des sols de potagers, laquelle excède souvent celle des sols agricoles situés dans un même contexte environnemental (des Ligneris et al., 1999 ; Douay et al., 2008b). Outre les retombées de poussières sur ces sols en lien avec les activités industrielles, cette forte contamination peut aussi être expliquée par les pratiques culturales des jardiniers comme l'utilisation d'eaux pluviales récupérées sur les toitures poussiéreuses pour l'irrigation, l'apport de matériaux contaminés, des remaniements, l'utilisation massive de produits phytosanitaires... Sur le site atelier Metaleurop, le LGCgE-ISA Lille

a été pionnier en termes d'investigations sur les productions végétales, notamment par la mesure des concentrations en Cd, Pb et Zn des cultures (des Ligneris et al., 1999 ; Douay et al., 2001a, 2001b). L'expérience acquise permet de disposer à ce jour de données sur les principales productions végétales produites dans les exploitations agricoles et dans les potagers familiaux et ceci, avant et après l'arrêt des activités de la fonderie (Pruvot et al., 2006 ; Douay et al., 2005, 2006, 2011).

Avant d'aborder plus spécifiquement la bioaccessibilité orale des métaux dans la matrice « légumes », j'ai étudié la qualité des productions (agricoles et légumes des jardins potagers privatifs) et ceci, sept ans après la fermeture de Metaleurop Nord. Cette étude a fait l'objet d'une publication **[10]** insérée cidessous.

Douay F., Pelfrêne A., Planque J., Fourrier H., Richard A., Roussel H., Girondelot B., 2013. Assessment of potential health risk for inhabitants living near a former lead smelter. Part 1: metal concentrations in soils, agricultural crops, and homegrown vegetables. Environmental Monitoring and Assessment 185, 3665-3680.

En résumé...

Quatre-vingt-onze sites ont été sélectionnés aux alentours de l'ancienne fonderie incluant 57 sites agricoles et 34 jardins potagers. Les productions agricoles étudiées sont le blé (grain et paille), l'orge (grain et paille), le maïs (grain et fourrager), les féveroles, la pomme de terre et la betterave sucrière. Parmi les légumes autoproduits, ont été échantillonnés le radis, la laitue, le haricot vert, la carotte, le poireau, la tomate et la pomme de terre. La préparation des légumes a mimé les pratiques d'un consommateur minutieux (lavés et pelés si nécessaire).

Malgré la fermeture de l'usine en 2003, les productions végétales présentent des concentrations en Cd et Pb nettement supérieures à celles mesurées dans des végétaux obtenus sur des sols réputés non contaminés et ceci, au point de ne pas respecter les valeurs réglementaires en vigueur pour l'alimentation humaine (Règlement UE 2015/1005 de la Commission du 25 juin 2015). En 1999, des mesures ont été définies par les autorités lors du Plan d'Intérêt Général quant au devenir des parcelles agricoles et sont en cours de révision au regard des résultats de l'étude confiée au LGCgE-ISA Lille par l'ADEME en 2010 (Douay et al., 2011). Pour les productions potagères des jardins familiaux, aucune restriction ou interdiction n'a été imposée sur la production et la consommation. Compte tenu du degré de contamination élevé en métaux des sols urbains et de leur utilisation par les jardiniers à des fins de productions alimentaires, se posent les questions de la qualité sanitaire des denrées produites et surtout, de l'exposition des jardiniers et de leurs familles en lien avec leur consommation. Aussi, mon intérêt s'est porté plus spécifiquement sur la problématique des denrées autoproduites dans les jardins privatifs.

Assessment of potential health risk for inhabitants living near a former lead smelter. Part 1: metal concentrations in soils, agricultural crops, and homegrown vegetables

Francis Douay · Aurélie Pelfrêne · Julie Planque · Hervé Fourrier · Antoine Richard · Hélène Roussel · Bertrand Girondelot

Received: 5 January 2012/Accepted: 25 July 2012/Published online: 11 August 2012 © Springer Science+Business Media B.V. 2012

Abstract Soil contamination by metals engenders important environmental and health problems in northern France where a smelter (Metaleurop Nord) was in activity for more than a century. This study aims to look at the long-term effects of the smelter after its closedown by combining data on the degree of soil contamination and the quality of the crops grown (agricultural crops and homegrown vegetables) in these soils for a better

F. Douay · A. Pelfrêne · J. Planque · H. Fourrier Université Lille Nord de France, 59000 Lille, France

F. Douay · A. Pelfrêne (⊠) · J. Planque · H. Fourrier
Groupe ISA, Equipe Sols et Environnement, Laboratoire
Génie Civil et géo-Environnement Lille Nord de France
(LGCgE),
EA 4515, 48 Boulevard Vauban,
59046 Lille Cedex, France
e-mail: aurelie.pelfrene@isa-lille.fr

A. Richard
Laboratoire d'Analyses des Sols, Institut National de la Recherche Agronomique,
273 rue de Cambrai,
62000 Arras, France

H. RousselDépartement Sites et Sols pollués, ADEME,21 rue du Grésillé,49000 Angers, France

B. Girondelot
Délégation Régionale Nord Pas de Calais, ADEME,
20, rue du Prieuré,
59500 Douai, France

assessment of the local population's exposure to Cd, Pb, and Zn. Seven years after the Metaleurop Nord closedown, (1) the agricultural and urban topsoils were strongly contaminated by Cd, Pb, and Zn; (2) the kitchen garden topsoils were even more polluted than the agricultural soils, with great variability in metal concentrations within the gardens studied; (3) a high proportion of the agricultural crops for foodstuffs did not conform with the European legislation; (4) for feedstuffs, most samples did not exceed the Cd and Pb legislation limits, indicating that feedstuffs may be an opportunity for most agricultural produce; and (5) a high proportion of the vegetables produced in the kitchen gardens did not conform with the European foodstuff legislation. The high contamination level of the soils studied continues to be a risk for the environment and the population's health. A further investigation (part 2) assesses the associated potential health risk for local inhabitants through consumption of homegrown vegetables and ingestion of soil particles by estimating the site-specific human health assessment criteria for Cd and Pb.

Keywords Hazardous elements · Soils · Cereals · Legumes · Lead works · Population exposure

Introduction

Mining and smelting activities are the main sources of metals in the environment, which can result in considerable soil contamination. The accumulation of metals in soils can have adverse effects on environmental health, crop growth, and food quality and is of great concern because of the potential health risk to the local inhabitants if directly ingested or transferred through food (Alam et al. 2003; Bermudez et al. 2011; Finster et al. 2004; Hough et al. 2004; Wang et al. 2005). The consumption of crops produced in contaminated soils, as well as ingestion or inhalation of contaminated soil particles, are the main pathways of human exposure to metals. Cultivation of crops on contaminated soils can potentially lead to the accumulation of metals in the edible plant parts with detrimental effects on soil ecosystems resulting in a risk to human and animal health (Cui et al. 2004; Hough et al. 2004; McBride 2007; Moolenaar and Lexmond 1999; Nabulo et al. 2010; Wang et al. 2005). Cd exposure may pose adverse health effects, including kidney dysfunction, and skeletal disorders, and may also affect bones and result in fractures (Jarup 2003). Long-term exposure to Pb may cause neurological disorders such as memory deterioration, prolonged reaction times, and reduced cognitive ability (Jarup 2003; Oliver 1997). Although Zn is an essential element, its excessive concentration in food plants is of great concern because of its toxicity to humans (Kabata-Pendias and Mukherjee 2007).

Soil quality is a major concern in the North of France, especially in the former mining areas, due to the past industrial context and the strong demographic pressure. For more than a century up to 2003, Metaleurop Nord, the main European lead smelter situated in Noyelles-Godault, generated significant quantities of dust (Frangi and Richard 1997; Godin et al. 1985; Sterckeman et al. 2000, 2002). The emissions generated by this smelter have led to substantial contamination of the surrounding soils. The pollutants were mainly Cd, Pb, and Zn but also to a lesser degree As, Hg, Sb, and In (Sterckeman et al. 2000, 2002). The epidemiological studies carried out during the industrial activity showed that 10-15 % of children (2-4 years old) living near the smelter had blood Pb levels higher than 100 μ g Pb L⁻¹ (elevated blood Pb level defined by the Centers for Disease Control and Prevention). This reached 30 % in the town situated close to the smelter and under the prevailing winds (Leroyer et al. 2000; 2001).

In 1999, a General Interest Project (GIP) was set up following a request from the authorities based on the

Pb and Cd concentrations in topsoils: the first zone with soil concentrations over 1,000 mg of Pb kg⁻¹ and 20 mg of Cd kg⁻¹ of soil and the second zone within the range of 500–1,000 mg of Pb kg⁻¹ of soil. Soils with a concentration below 500 mg of Pb kg⁻¹ were not included in the GIP. For any land use, the GIP defined very strict recommendations on how to manage the contaminated land. The GIP planned to exclude the most heavily contaminated fields (>500 mg of Pb kg⁻¹ of soil) from agricultural production and to stabilize the soil by herbaceous and planted tree coverage. As for homegrown vegetables, however, no ban has been imposed on their production and consumption.

Economic problems closed Metaleurop Nord in 2003, leaving behind a large area of spoiled agricultural and urban soils but also a serious socioeconomic crisis. Since the closedown and the industrial site renovation, dust emissions have entirely ceased. However, the environmental and health problems induced by high contamination of the area remained worrisome, especially the urban soils, which exceeded metal concentrations of agricultural soils located in a similar environmental context (Douay et al. 2008a; Sterckeman et al. 2002). This is explained by gardeners who add various contaminated materials to their garden soils (smelter slag, water collected from dusty roofs, etc.). Various studies have shown that vegetables grown in kitchen gardens close to Metaleurop Nord, both before and just after closing, frequently exceeded the European legislation limits for Cd and Pb concentrations (Douay et al. 2008b, c; Pruvot et al. 2006).

In 2010, the authorities decided to conduct a new study in order to verify the relevance of the measures defined within the GIP. The topsoils, agricultural crops, and homegrown vegetables were sampled in a large area around the former smelter. This work aims to look at the long-term effects of the Metaleurop Nord closedown by combining data on the degree of soil contamination and the quality of the crops grown in these soils for a better assessment of the population's exposure to metals. The present study focuses on the quality of soils and was conducted on both agricultural and urban lands as follows: (1) evaluation of the degree of soil contamination by Cd, Pb, and Zn in agricultural fields and kitchen gardens and (2) determination of the metal concentrations of agricultural crops and vegetables. In addition, the crops' metal concentrations were examined with regard to the European legislation maximum levels for foodstuffs and feedstuffs. Part 2 of this study, which will appear in a separate publication (Pelfrêne et al. 2012), will be devoted to assessing the potential health risk associated with local inhabitants through consumption of homegrown vegetables and ingestion of soil particles by estimating site-specific Cd and Pb criteria for human health assessment.

Materials and methods

Sampling sites

Ninety-one sampling sites were selected in the vicinity of the former Metaleurop Nord smelter (50°25'41.08" N and 3°00'53.08" E), including 57 agricultural fields (named AF-1 to AF-57) and 34 kitchen gardens (named KG-1 to KG-34), in order to consider various environmental contexts (Fig. 1). These sites extended over the zone that was highly affected in the past by smelter dust emissions (approximately 30 km²). The distance of the sampling sites varied from 0.7 to 3.3 km from the former large smokestack (main dust emissions) of the smelter. Soils around the former Metaleurop Nord smelter originate from loessic materials and occasionally have developed from alluvial deposits (Sterckeman et al. 2000, 2006). The surface layers of the soils studied showed mainly a loamy texture that was sometimes carbonated and where the clay and more particularly the sand contents vary considerably (Sterckeman et al. 2000).

The sampled agricultural sites were selected based on knowledge on the expected spread of Pb and Cd contamination of this area and on agricultural land management (Sterckeman et al. 2000, 2002). The studied crops included wheat (grain and straw; *Triticum aestivum* L.), barley (grain and straw; *Hordeum vulgare* L.), maize (grain and forage; Zea mays L.), horse bean (*Vicia faba* L.), potato (*Solanum tuberosum* L.), and sugar beet (*Beta vulgaris* L.). At each sampling site, paired soil (0–25 cm deep) and plant samples were collected. Twelve random soil samples on each plot were taken and bulked together as one composite sample (n=57).

For the kitchen gardens, few data are available on management practices. In the studied area, aerial photos identified approximately 310 kitchen gardens adjoining houses. These gardens were selected based on their location, exposure, and the gardener's willingness to participate in the study. A total of 45 gardeners participated in our door-to-door survey and different approaches were undertaken: (1) a questionnaire was administered in the studied area in April-May 2010 to determine gardeners' practices; (2) at least one soil profile (up to 120 cm) was carried out with a hand auger for each garden to determine heterogeneity, complexity, presence, and relative importance of anthropogenic material, etc.; (3) the average contamination level of the topsoil (0-25 cm deep) was assessed with one composite sample comprising at least 20 subsamples for each garden. A total of 34 completed questionnaires were usable. The data recorded included the garden's characteristics (age, surface area, gardening practices, etc.), the vegetables grown, the age and gender of the gardener, and the number of family members in the household. From the questionnaire, the main vegetables produced and selected for study were radish (Raphanus sativus L.), lettuce (Lactuca sativa L.), French bean (Phaseolus vulgaris L.), carrot (Daucus carota L.), leek (Allium porrum L.), tomato (Solanum lycopersicum L.), and potato (S. tuberosum L.). The gardeners received the same vegetable cultivars (seeds and seedlings) in order to reduce variability in metal accumulation within species and grew all the vegetables themselves. We sampled the vegetables at their consumption stages, taking care to obtain a representative sample (of the vegetable) and sufficient dried matter for the analyses. At each sampling plot, paired soil (0-25 cm deep) and vegetable samples were collected. From three to seven random soil samples on each plot were taken and bulked together as one composite sample. Because of gardening crop failures, certain vegetables were missing in some kitchen gardens. So a total of 207 samples of vegetables and corresponding soil samples were collected from the kitchen gardens and packed into polyethylene bags.

Because urban soils such as kitchen garden soils can be highly disturbed by human activities, at least one soil profile was carried out for each garden studied to describe and characterize them. The kitchen gardens (1–150 years old) were situated in a highly urbanized area, adjoining houses. In most cases, the garden soils were developed on composite materials and showed signs of disturbance as deep as 60 cm, with the presence of coarse elements, slags, fragments of brick, coal ashes, and various other materials. From the questionnaire, most gardeners (>70 %) affirmed that large amounts of chemical fertilizers and/or herbicides were applied to their gardens over a long period.



Fig. 1 Location of the sampled sites in northern France

Moreover, in past times, most gardeners added exogenous materials to the soil to improve its permeability and facilitate cropping practices.

Sample preparation and analysis

The soil samples, collected in agricultural fields and kitchen gardens, were prepared according to the NF ISO 11464 standard. Samples were oven-dried at 40 ° C and crushed to pass through a 2-mm stainless steel sieve. For each soil sample, a representative subsample was obtained with an automatic sieve using an ultracentrifugal mill less than 250 μ m (Retsch type ZM 200, Germany) for total dissolution analysis. Calcination at 450 °C and a mixture of hydrofluoric and

perchloric acids, as described by the NF X 31–147 standard, were used for total dissolution of Cd, Pb, and Zn.

Parts of the plant not for consumption or those that were damaged were removed. Similar to agricultural and food-industry practices, the grain (wheat, barley, maize, and horse bean), straw (wheat and barley), and foraged maize were not washed. The sugar beets were meticulously brushed under a trickle of tap water. The other vegetable samples were prepared as a careful consumer would prepare them to eat, with the elimination of the inedible parts and meticulous cleaning in three successive washings of tap water. All precautions were taken to avoid possible contamination. All samples were then cut into small pieces to obtain a representative sample, packed in a polypropylene sachet, kept cool, and transmitted as soon as possible to the laboratory where there were freeze-dried. They were crushed with a cutting mill in tungsten carbide with a 0.5mm grid. A representative part was then digested with concentrated nitric acid and hydrogen peroxide using a closed microwave.

The concentrations of metals in soils and vegetables were quantified by the INRA Soil Analysis Laboratory (Arras, France) accredited by COFRAC according to the ISO 17025 standard. The Zn and high concentrations of Cd and Pb were measured by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICPOES, Vista Pro, Varian, France). The low concentrations of Cd and Pb were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS, Série X2, Thermo, France).

Data analysis

Soil metal concentrations were expressed in milligrams per kilogram of dry weight and were compared with regional references (Sterckeman et al. 2002; Douay et al. 2009).

Crop metal concentrations expressed in milligrams per kilogram of dry weight were used to study the crop/soil behavior, i.e., to calculate the transfer factor (TF) defined as the ratio of metal concentration in the plant to the total metal concentration in soil (Cui et al. 2004; Kachenko and Singh 2006). The ones expressed in milligrams per kilogram of fresh weight were used to evaluate the inhabitants' exposure and were compared with the legislation limits (European Directive of 19 December 2006 for human consumption and French Decree of 12 January 2001 for animal consumption). These legislative limits define the maximum permissible concentrations in foods for human and animal consumption (European Commission 2006). These limit values were expressed on a 15 % humidity basis for foodstuffs and a humidity content of 12 % was considered for feedstuffs.

The data were statistically analyzed using XLSTAT 2011.3.01 (Addinsoft). The measures were expressed in terms of medians and/or means with standard deviations.

Results and discussion

Metal concentrations in agricultural and kitchen garden soils

Table 1 presents the total metal concentrations of the organo-mineral horizon in the agricultural and kitchen garden soils studied. In agricultural topsoils, the results showed a wide range of concentrations, which varied for Cd from 2.3 to 15.4 mg kg⁻¹, for Pb from 108 to 828 mg kg⁻¹, and for Zn from 193 to $1,052 \text{ mg kg}^{-1}$. The kitchen garden topsoils were more polluted than the agricultural soils and metal concentrations varied for Cd from 2.8 to 21.1 mg kg⁻¹, for Pb from 190 to 1,425 mg kg⁻¹, and for Zn from 199 to 2,429 mg kg⁻¹. This was explained by the soil uses, the past or present anthropogenic activities (removal and deposition of various contaminated materials, gardening practices, atmospheric fallout linked to circulating traffic, urban heating, and industrial activities), the corrosion of building materials, etc. The metal concentrations in soils were compared with the regional agricultural values; not enough data were available for the contamination degree of the regional urban soils. The comparison confirmed their high level of contamination. For the agricultural soils, the mean Cd, Pb, and Zn concentrations were 13-, 9-, and 6-fold, respectively, greater than the regional agricultural values. This difference was also considerable for the kitchen garden soils. Thus, the mean Cd, Pb, and Zn concentrations in kitchen garden soils were 21-, 16-, and 11-fold, respectively, more contaminated than regional soils. The degree of contamination appeared to be related to the use of the studied soils.

With the kitchen gardens, two types of soil sampling were carried out per garden: (1) one composite soil sample to provide an estimate of average soil concentration (Tables 1 and 2) and (2) several composite soil samples collected in each homegrown vegetable sample to determine the ranges of metal levels in each kitchen garden (Table 2). The metal concentrations among the 34 kitchen gardens varied greatly, independently of the smelter's distance. For example, the concentrations of Cd, Pb, and Zn in KG-15 soil averaged 3.0, 180, and 214 mg kg⁻¹, respectively, while those in KG-13 soil averaged 13.4, 1,669, and 2,679 mg kg⁻¹, respectively (or 4, 9, and 12 times as much, respectively). The particularly high spatial variability in concentrations observed between the 34

	Contaminat	ed area					Regional va	lues	
	Agricultural	l fields ($n=57$)		Kitchen gar	rdens ($n=34$)		Agricultural	fields ^a ($n=232$))
	Median	Mean	SD	Median	Mean	SD	Median	Mean	SD
Cd	4.9	5.2	2.0	7.4	8.3	4.2	0.4	0.4	0.2
Pb	254	277	110	464	526	317	29	32	17
Zn	364	377	133	621	749	461	67	68	25

Table 1 Median, mean, and standard deviation (SD) values for total Cd, Pb, and Zn concentrations in the topsoils studied and in regional agricultural topsoils

Results are expressed in milligrams per kilogram of dry weight

^a From Sterckeman et al. (2002)

kitchen gardens can be explained by the anthropogenic soil modifications resulting from residential activities, confirming the absence of a nonlinear relationship between metal concentrations and the distance to the smelter (as reported by Douay et al. 2008a, b). Variations of metal concentrations within each garden were represented by the 3- to 7-fold range and relative standard deviation (RSD) (Table 2). Concentrations of Cd, Pb, and Zn showed relatively low variability with RSD less than 10 % within 15, 18, and 16 kitchen gardens, respectively. However, many soils (19, 16, and 18 kitchen gardens for Cd, Pb, and Zn, respectively) displayed large variations of metal concentrations (RSD>10%). For example, KG-16 showed variations for Cd from 5.3 to 8.6 mg kg^{-1} with a RSD of 23.1 %; KG-18 provided evidence of variations for Pb from 387 to 1,484 mg⁻¹ with a RSD of 60.2 %; and KG-13 showed variations for Zn from 1,864 to 3,591 mg kg⁻¹ with a RSD of 26.1 %. The high RSD recorded in these kitchen gardens was consistent with soils having undergone considerable disturbance. This specific enrichment is often combined with a high heterogeneity and variability of the physicochemical parameters of soils. This can be caused by different reasons like the input of contaminated materials, especially slag resulting from the combustion of coal and used to improve soil drainage, the various industrial activities, the utilization of pesticides, the watering of vegetables with rainwater collected on dusty roofs, but also by the dust emission due to motor vehicle traffic (Finster et al. 2004). Few studies have examined the spatial variability of metal concentrations within residential soils and showed that greater numbers of samples may be required due to disturbances of soil and contaminant concentrations resulting from residential activities (Arrouays et al. 1996; Machemer and Hosick 2004). For each garden, the comparison of average soil metal concentrations (obtained from one composite soil sample taking into account the entire garden) with the range of values (obtained from several composite soil samples collected at each vegetable sampling) often provided evidence of high spatial variability in surface soil metal contamination. As reported by Arrouays et al. (1996), this spatial variability is too great to determine a mean value with a high level of confidence and could have important implications for assessment of local inhabitants' exposure to these metals.

Agricultural crops and homegrown vegetables

Metal concentrations in agricultural crops and homegrown vegetables

Tables 3 and 4 present the mean values and the standard deviations of Cd, Pb, and Zn concentrations measured in agricultural crops and homegrown vegetables (in fresh weight). For the agricultural crops, the results showed that: (1) the highest concentrations of Cd were measured in wheat straw and foraged maize, and, to a lesser extent, in wheat grain, horse bean, barley straw, and sugar beet, while the lowest concentrations were recorded in barley and maize grains as well as potato; (2) the Pb concentrations were under the detection limit in most cases, except in wheat and barley straw, foraged maize and sugar beet; and (3) the highest concentrations of Zn were found in horse bean and foraged maize, while the lowest concentrations

Avera	ge soil metal con	centrations	Range of me	stal concentrat	ions at each ve _i	getable										
Cd (mg k	$Pb = (mg kg^{-1})$	Zn (mg kg ⁻¹)	Cd				Pb					Zn				
2)) /	$\mathop{\rm Min}_{({\rm mg}kg^{-1})}$	$\max_{(mg \ kg^{-1})}$	$\mathop{\rm Mean}\limits_{({\rm mg}\ kg^{-1})}$	$\frac{SD}{(mg kg^{-1})}$	$\underset{\text{6}}{\text{Min}} \underset{\text{(mg kg}^{-1})}{\text{Min}}$	${\mathop{\rm Max}}_{{\mathop{\rm (mg \ kg}}^{-1})}$	$\mathop{\rm Mean}_{({\rm mg}{\rm kg}^{-1})}$	$\sup_{({\rm mg}\;kg^{-1})}$	%	$\mathop{\rm Min}_{({\rm mg}\;{\rm kg}^{-1})}$	${\mathop{\rm Max}}_{{\mathop{\rm (mg \ kg}}^{-1})}$	Mean (mg kg ⁻¹)	$\sup_{({\rm mg}\; kg^{-1})}$	%
KG-1 7.1	436	600	6.4	7.3	6.8	0.3 4	1.9 410	539	471	38	8.2	534	782	648	78	12.0
KG-2 8.9	542	725	8.2	9.0	8.5	0.3	3.0 552	624	585	25	4.3	686	980	863	95	11.0
KG-3 6.3	367	553	5.8	7.2	6.6	0.5	7.1 361	426	387	23	6.0	538	625	593	28	4.7
KG-4 5.1	343	465	3.8	5.8	5.0	0.7	13.9 291	418	353	46	13.0	389	541	472	59	12.4
KG-5 6.1	363	446	5.2	7.5	6.2	0.8	13.7 343	432	381	33	8.7	412	507	450	36	8.0
KG-6 3.8	214	349	3.6	4.0	3.8	0.2	4.2 217	236	225	7	3.3	351	392	378	14	3.7
KG-7 12.6	890	1,034	11.2	14.3	12.5	1.3	10.4 815	942	881	55	6.2	928	1,103	1,036	82	7.9
KG-8 7.7	482	662	5.8	7.9	7.3	0.8	10.8 374	662	466	105	22.4	470	768	660	123	18.6
KG-9 7.7	453	626	6.4	7.2	6.8	0.3	1.6 384	549	424	63	14.9	539	643	582	39	6.7
KG-10 7.7	465	572	7.3	8.6	8.0	0.4	5.1 456	511	480	20	4.2	530	619	566	30	5.2
KG-11 14.7	1,046	1,310	14.1	16.1	15.0	0.8	5.6 977	1,145	1,064	69	6.5	1,270	1,442	1,347	69	5.1
KG-12 10.3	598	752	7.0	11.7	10.7	1.7	15.7 491	725	675	82	12.2	733	1,160	851	150	17.6
KG-13 12.6	1,410	2,429	12.0	14.4	13.4	0.9	7.0 1,314	2,040	1,669	302	18.1	1,834	3,591	2,679	869	26.1
KG-14 4.3	278	479	3.6	4.7	4.1	0.5	12.0 271	336	300	27	9.1	407	606	479	77	16.2
KG-15 2.8	209	199	2.8	3.3	3.0	0.2	5.8 174	193	180	7	4.0	197	233	214	14	6.7
KG-16 7.3	510	785	5.3	8.6	6.8	1.6	23.1 388	530	453	67	14.8	686	861	779	92	11.8
KG-17 12.7	742	006	10.5	16.9	14.0	2.3	16.4 761	1,048	867	119	13.8	776	1,183	986	146	14.8
KG-18 10.5	533	671	7.4	10.8	9.0	1.3	14.2 387	1,484	634	381	60.2	494	782	631	116	18.5
KG-19 21.1	1,425	1,955	15.7	23.1	19.7	2.9	14.8 1,109	2,145	1,458	357	24.5	1,602	2,584	2,009	312	15.5
KG-20 19.3	1,061	1,419	18.5	20.6	19.1	0.8	4.1 1,092	1,238	1,174	52	4.4	1,473	1,784	1,614	115	7.1
KG-21 10.6	676	1,108	11.3	15.0	13.3	1.6	12.1 636	924	787	116	14.8	883	1,179	1,041	134	12.9
KG-22 3.9	190	340	3.5	4.4	3.9	0.4	9.5 161	212	193	20	10.3	303	394	353	33	9.4
KG-23 7.5	475	616	5.1	7.7	7.0	0.9	12.8 443	553	490	33	6.8	409	719	570	95	16.7
KG-24 4.6	226	349	4.2	5.7	4.8	0.5	10.3 213	260	239	15	6.4	329	399	359	25	7.1
KG-25 7.5	477	613	6.3	9.8	7.5	1.2	16.0 400	627	477	78	16.4	547	707	595	59	9.9
KG-26 6.5	420	499	6.7	8.1	7.2	0.8	11.4 398	465	423	36	8.6	461	512	478	30	6.2
KG-27 5.7	326	478	5.2	5.8	5.5	0.2	4.4 313	365	339	23	6.7	420	535	470	52	11.0
KG-28 4.4	224	294	2.4	4.9	3.8	1.0	26.7 148	233	196	40	20.6	190	322	270	60	22.1
KG-29 4.6	239	450	4.2	4.9	4.6	0.3	5.5 235	268	255	11	4.3	426	487	459	19	4.2
KG-30 6.8	295	583	6.7	7.9	7.3	0.4	5.9 275	294	285	7	2.6	581	630	600	17	2.8
KG-31 6.4	462	962	5.9	8.8	7.5	1.0	13.0 534	1,358	797	287	36.0	1,105	1,807	1,530	244	15.9
KG-32 8.4	507	686	8.6	12.7	10.9	1.6	14.7 498	850	707	143	20.2	694	1,165	843	190	22.5
KG-33 4.8	274	626	4.5	5.0	4.8	0.2	3.3 254	275	263	6	3.4	570	649	625	26	4.2
KG-34 10.8	725	939	9.4	12.8	11.1	1.4	13.0 561	796	695	120	17.2	672	1,077	908	204	22.5

	Cd		Pb		Zn		Legislat	ion limits	Noncompliance ratio
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Cd	Pb	
Human consump	tion (mg kg	⁻¹ FW)							
Wheat grain	0.33	0.16	< 0.19	_	35.0	6.8	0.2	0.2	13/18
Barley grain	0.16	0.07	< 0.19	-	43.4	6.0	0.1	0.2	5/7
Maize grain	0.04	0.04	< 0.19	-	20.7	2.2	0.1	0.2	1/10
Horse bean	0.35	0.13	< 0.19	-	62.8	7.7	0.1	0.2	7/7
Potato	0.09	0.04	< 0.19	-	16.1	2.9	0.1	0.1	2/4
Sugar beet	0.31	0.16	0.28	0.16	33.0	13.7	0.1	0.1	11/11
Animal consump	tion (mg kg	$^{-1}$ FW)							
Wheat grain	0.34	0.16	< 0.19	_	36.2	7.0	1.0	10	0/18
Wheat straw	0.80	0.39	0.86	0.50	22.7	11.2	1.0	10	5/18
Barley grain	0.17	0.07	< 0.19	-	44.9	6.3	1.0	10	0/7
Barley straw	0.34	0.16	0.66	0.30	40.0	14.0	1.0	10	0/7
Maize grain	0.05	0.04	< 0.19	-	21.4	2.3	1.0	10	0/10
Foraged maize	0.85	0.72	0.87	0.45	62.4	25.9	1.0	10	4/10
Horse bean	0.36	0.14	< 0.19	-	65.0	8.0	1.0	10	0/7
$(mg kg^{-1} DW)$									
Wheat grain	0.39	0.18	< 0.22	-	41.1	7.9			
Wheat straw	0.91	0.44	0.98	0.57	25.8	12.7			
Barley grain	0.19	0.08	0.24	-	51.1	7.1			
Barley straw	0.39	0.18	0.75	0.34	45.5	15.9			
Maize grain	0.05	0.05	< 0.22	-	24.3	2.6			
Foraged maize	0.97	0.82	0.99	0.52	70.9	29.4			
Horse bean	0.41	0.16	< 0.22	_	73.8	9.1			
Potato	0.41	0.14	< 0.22	_	19.0	3.4			
Sugar beet	1.38	0.69	1.23	0.69	38.8	16.1			

Table 3 Cd, Pb, and Zn concentrations in the agricultural cropswith regard to the legal values (European Directive of 19 December 2006 for human consumption and French Decree of 12

January 2001 for animal consumption) and the noncompliance ratio (the number of samples not in compliance with the legislation compared with the total sample number)

Mean and standard deviation values are given in milligrams per kilogram of fresh weight (FW) and in milligrams per kilogram of dry weight (DW)

were measured in maize grain and potato (Table 3). Moreover, the ratio between straw (or foraged) and grain concentrations (for wheat, barley, and maize) was quite high for Cd and Pb. The storage organs seemed to be less metal-accumulating than the foliar system. Weber and Hrynczuk (2000) found that Cd and Pb concentrations in wheat grains were almost ten times lower than those found in straw, thus explaining the low uptake and the low translocation of Cd and Pb in the vegetative organs because of a lack of specific carriers (ion exchangers), which may in a significant way influence the percentage of these elements' accumulation in wheat grains. The concentrations of metals in wheat grain ranged from 0.15 to 0.66 mg kg⁻¹ dry weight (DW) for Cd, from 29.8 to 60.0 mg kg⁻¹ (DW) for Zn, were <0.22 mg kg⁻¹ (DW) for Pb, and were substantially higher or comparable than the concentrations recorded by other authors: 0.006–0.043 mg kg⁻¹ for Cd, 0.022–0.269 mg kg⁻¹ for Pb, and 7.8–56.4 mg kg⁻¹ for Zn by Bermudez et al. (2011); 0.070 mg kg⁻¹ for Cd, 0.007 mg kg⁻¹ for Pb, and 24.0 mg kg⁻¹ for Zn by Kabata-Pendias and Mukherjee (2007); and 0.05–0.48 mg kg⁻¹ for Cd by Rafiq et al. (2006). In potato, the concentrations of metals ranged from 0.26 to 0.58 mg kg⁻¹ (DW) for Cd, from 15.9 to 22.1 mg kg⁻¹ (DW) for Zn, and were <0.22 mg kg⁻¹

Table 4 Cd, Pb, and Zn concentrations in the homegrownvegetables with regard to the legal values (European Directiveof 19 December 2006 for Cd and Pb and Chinese Food Hygiene

Standard for Zn) and noncompliance ratio (number of samples not in compliance with the legislation compared with the total sample number)

	Cd	Cd			Zn	Zn		tion limits		Noncompliance ratio
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Cd	Pb	Zn	
$(mg kg^{-1} FW)$										
Radish	0.12	0.08	0.15	0.09	6.43	3.27	0.1	0.1	20	23/34
Lettuce	0.39	0.39	0.15	0.16	5.94	4.70	0.2	0.3	20	22/33
French bean	0.01	0.01	0.06	0.05	4.39	1.73	0.05	0.1	20	3/32
Carrot	0.15	0.09	0.21	0.13	4.03	1.28	0.1	0.1	20	26/28
Potato	0.17	0.07	0.07	0.02	5.60	1.38	0.1	0.1	20	27/30
Leek	0.16	0.10	0.09	0.05	5.44	3.16	0.1	0.1	20	19/26
Tomato	0.04	0.02	0.04	0.06	1.38	0.37	0.05	0.1	20	7/24
$(mg kg^{-1} DW)$										
Radish	2.49	1.36	3.19	1.98	136.0	72.0				
Lettuce	6.76	5.54	2.72	3.27	107.7	77.3				
French bean	0.13	0.08	0.59	0.65	41.7	8.8				
Carrot	1.53	0.96	2.14	1.41	40.5	13.6				
Potato	0.83	0.38	0.35	0.11	27.2	7.6				
Leek	2.16	1.72	1.14	0.61	72.6	56.6				
Tomato	0.73	0.31	0.81	1.23	26.8	7.4				

Mean and standard deviation values are given in milligrams per kilogram of fresh weight (FW) and milligrams per kilogram of dry weight (DW)

(DW) for Pb. For Cd, the concentrations were slightly lower or comparable to the concentrations recorded by others authors: $0.3-1.0 \text{ mg kg}^{-1}$ by Dudka et al. (1995), $0.15-3.88 \text{ mg kg}^{-1}$ by Dudka et al. (1996), and $0.24-1.12 \text{ mg kg}^{-1}$ by McLaughlin et al. (1997). However, these concentrations were substantially higher than those recorded by Srek et al. (2010) ($0.02-0.07 \text{ mg kg}^{-1}$). For Pb, the concentrations were substantially lower than those recorded by other authors: $0.49-1.37 \text{ mg kg}^{-1}$ by Srek et al. (2010); $0.5-4.5 \text{ mg kg}^{-1}$ by Dudka et al. (1995); $0.2-15.4 \text{ mg kg}^{-1}$ by Dudka et al. (1996); and 3.19 mg kg^{-1} by Antonious and Snyder (2007). For Zn, the concentrations were comparable with values published by Srek et al. (2010) ($13.6-24.5 \text{ mg kg}^{-1}$).

For the homegrown vegetables, the results showed that: (1) the highest concentrations of Cd were obtained in lettuce, and, to a lesser extent, in leek, potato, carrot, and radish, while the lowest concentrations were measured in French bean and tomato; (2) carrot, radish and lettuce presented the highest Pb concentrations, while French bean, potato, leek and tomato showed the lowest concentrations; and (3) the lowest concentrations of Zn were found in tomato (Table 4). The order of accumulation and the mean concentrations of metals measured in lettuce, carrot, and French bean were comparable with values published by Alexander et al. (2006). Compared with the values recorded by Voutsa et al. (1996), the concentrations of Cd, Pb, and Zn on carrot, leek, and lettuce were higher or comparable. For example, in the present study, the concentrations of metals in carrot varied from 0.45 to 3.97 mg $\rm kg^{-1}$ for Cd, from 0.58 to 6.67 mg kg⁻¹ for Pb, and from 21.9 to 76.4 mg kg⁻¹ for Zn. In Voutsa et al. (1996), the values varied from 0.17 to 0.41 mg kg⁻¹ for Cd, from 0.08 to 0.71 mg kg⁻¹ for Pb, and from 11.9 to 113 mg kg⁻¹ for Zn. The results showed great variability in the concentrations depending on the species, the metal element, and the garden studied. Indeed, in the case of lettuce, tomato, and leek, the standard deviation values were very high, which was consistent with the high heterogeneity and variability of metal concentrations observed in some kitchen gardens. Moreover,

these results showed that the accumulation of metals in the plants vary according to the metal speciation, the vegetable species and the physicochemical parameters of the soils, as observed by other authors (Banat et al. 2005; Cobb et al. 2000).

Transfer of metal from soils to agricultural crops and homegrown vegetables

The TF was calculated as the ratio of the metal concentrations in the agricultural crops or homegrown vegetables (dry weight) to the metal concentrations in the topsoils (dry weight) (Fig. 2). The TF is an index that evaluates the transfer potential of a metal from soil to plant. A higher TF reflects relatively poor retention in soil or greater plant efficiency in absorbing a metal, and a low TF represents the strong sorption of a metal to the soil colloid (Alloways and Ayres 1997).

On average, the TFs of metal in agricultural crops were in the order Zn=Cd>Pb and those in homegrown vegetables were in the order Cd>Zn>Pb. The TF order of metal in homegrown vegetables agreed with the results of previous studies (Khan et al. 2008; Liu et al. 2005; McBride 2003; Wang et al. 2006; Zhuang et al. 2009). However, these TF orders differed somewhat depending on the plant species. The average TFs of Cd, Pb, and Zn were 0.118, 0.003, and 0.127, respectively, in agricultural crops, and 0.277, 0.003, and 0.104, respectively, in homegrown vegetables (Fig. 2). The average TF values for Cd and Zn were 39 and 42 times greater than for Pb, respectively, in agricultural crops, and 92 and 35 times greater than for Pb, respectively, in homegrown vegetables, indicating that it is much easier for Cd and Zn to transfer from soil to the edible parts of the plants. However, the very low TF values for Pb (<0.005 for agricultural crops and <0.007 for homegrown vegetables) were comparable to the values recorded by Wang et al. (2006) and show that it is much more difficult for Pb to transfer from soil to the edible parts of the plants.

The results showed that TF values for Cd and Zn for agricultural crops and homegrown vegetables varied greatly between plant species and sites (field or garden). For agricultural crops: (1) the highest TF values for Cd were obtained in sugar beet (0.298 ± 0.176), while the lowest TF values for Cd were recorded in maize grain (0.009 ± 0.009) and (2) the highest TF values for Zn were found in barley grain and straw, foraged maize, and horse bean



Fig. 2 Transfer factors (*TF*) of Cd, Pb, and Zn: **a** from agricultural soils to crops and **b** from kitchen garden soils to vegetables. The *error bars* indicate the standard deviation. Note that the *Y* scales are different

 $(0.167 \pm 0.056, 0.189 \pm 0.034, 0.180 \pm 0.076, and$ 0.181±0.056, respectively) while the lowest TF values for Zn were obtained in maize grain and potato $(0.063\pm0.013$ and 0.070 ± 0.013 , respectively). For homegrown vegetables, lettuce was the vegetable that presented the highest TF values (0.929 ± 0.718) while French bean, potato, and tomato showed the lowest TF values (0.019±0.021, 0.107±0.048, and 0.105 ± 0.054 , respectively). Moreover, the highest TF values for Zn were obtained in radish and lettuce (0.204±0.113 and 0.180±0.130, respectively) while potato and tomato showed the lowest TF values for Zn (0.042±0.023 and 0.048±0.025, respectively). In previous studies, distinctive differences were also identified when comparing one vegetable to another, legumes (such as beans) tending to be low accumulators (Alexander et al. 2006; Flemming and Parle 1977), root vegetables (such as carrot and radish) tending to be moderate accumulators (Lehoczky et al. 1998) and leafy vegetables (such as lettuce) being high accumulators (Alexander et al. 2006; Lehoczky et al. 1998; Li et al. 2006). These results showed that the TF values differed between locations (field and garden) and plant species. The difference in TFs between fields or gardens may be related to the vegetable crop's physiological properties, soil nutrient management, and the physicochemical parameters of soils (especially pH, as reported by Golia et al. 2008). In the present study, soil pH values ranged from 7.3 to 8.3 (8.0 ± 0.3) for agricultural fields and from 6.3 to 8.3 (7.3 \pm 0.3) for kitchen gardens (data not presented here). The high pH can stabilize metals in soils, resulting in decreased leaching effects of elements. Thus, the metal concentrations in the soil solution are quite low, that restrain the absorbability of the metals from the soil solution and the translocation into the crop tissues.

Metal concentrations with regard to the legal values

The concentrations of Cd and Pb obtained for agricultural crops and homegrown vegetables were compared with the legal values given in the European Directive of 8 March 2001 and the French Decree of 12 January 2001. With regard to the legislation, the crops have to contain both Cd and Pb concentration levels below the legislation limits to be considered as acceptable for human or animal consumption. However, there are no European guidelines to enforce the maximum level of Zn in crops. In China, the Chinese Food Hygiene Standard defined a maximum permissible concentration of 20 mg of Zn per kilogram (fresh weight) for vegetables (SQMIQAC 2001). Only our homegrown vegetable Zn concentrations were compared with this limit. Tables 3 and 4 show the proportion of noncompliant samples.

A high percentage of agricultural crops for foodstuffs did not comply with the European legislation. Indeed, 72 % of the wheat grain, 100 % of the horse bean and sugar beet, 71 % of the barley grain, 50 % of the potato, and 10 % of the maize grain samples were over the foodstuff limit values (Table 3). For feedstuffs, most samples did not exceed the Cd and Pb legislation limits, and only 28 % of the wheat straw samples and 40 % of the foraged maize samples were over the feedstuff limit values (Table 3). A significant proportion of the vegetables produced in the kitchen gardens did not comply with the European foodstuff legislation (Table 4): carrot (93 %), potato (90 %), leek (73 %), radish (68 %), and lettuce (67 %). For tomato and French bean, nonconformity with the European regulations was not systematic (29 and 9 %, respectively). The highest Zn level in the vegetables studied was below the Chinese Food Hygiene Standard of 20 mg kg^{-1} of fresh weight, except for one lettuce sample (25.7 mg kg⁻¹ of fresh weight). Excess Zn may be toxic to plants. However, the soil Zn threshold for producing safe vegetables is not available. Long et al. (2003) reported that leaf Zn levels in excess of 300- 600 mg kg^{-1} of dry weight is considered to be toxic to plants. In the present study, the Zn concentrations in agricultural crops were less than 141 mg kg⁻¹ of dry weight and those in homegrown vegetables were less than 300 mg kg⁻¹ of dry weight (except for one lettuce sample with a Zn concentration of 465 mg kg⁻¹).

Most agricultural crops exceeded the legislation limits for Cd while most homegrown vegetables exceeded the limits for both Cd and Pb. Because of the high correlation between Cd and Pb concentrations in soils (Pearson coefficient, r^2 =0.969 and 0.935 with p<0.0001 for agricultural and garden soils, respectively), the Cd concentration in soils was considered an indicator of pollution. Table 5 shows the proportion of plant samples for human consumption that did not respect the legal values with regard to a scale of soil Cd contamination. Four classes of soil contamination were discriminated: 2–5, 5–10, 10–15, and 15–25 mg of Cd per kg of soil. With Cd concentration in soils greater than 2 mg kg⁻¹, the agricultural crops (except

	Cd concentratio	ns in soils (mg kg^{-1})		
	2–5	5-10	10–15	15–25
Agricultural crops				
Wheat grain	4/7	9/11	-	-
Barley grain	5/7	_	-	-
Maize grain	0/2	1/8	_	-
Horse bean	3/3	4/4	_	-
Potato	2/4	_	-	—
Sugar beet	7/8	2/2	1/1	—
Homegrown vegetables				
Radish	2/8	12/17	6/6	3/3
Lettuce	4/8	10/17	5/5	3/3
French bean	0/8	0/15	1/5	2/4
Carrot	5/7	10/10	4/4	4/4
Potato	8/8	11/14	3/3	5/5
Leek	5/7	5/9	5/5	4/5
Tomato	1/6	1/11	3/5	2/2

 Table 5
 Number of samples that were noncompliant with the European limit values for human consumption (European Directive of 19 December 2006) with regard to the total number of samples

This interpretation is a double analysis of both Cd and Pb concentrations in edible parts with regard to Cd soil concentration

for maize grain) were not in accordance with the regulations. Similar observations were made for radish, lettuce, carrot, potato, and leek when the soil concentration of Cd exceeded 5 mg kg⁻¹. French bean and tomato did not comply with the regulations with a concentration of Cd in soils higher than 15 and 10 mg kg⁻¹, respectively.

Long-term effects of the smelter closedown on metal concentrations in agricultural crops and homegrown vegetables

The long-term effects of the Metaleurop Nord closedown were evaluated by comparing the metal concentrations in agricultural crops and homegrown vegetables before the smelter closed down in 2003 (Douay et al. 2008b; Pruvot et al. 2006) to those obtained in the present study (i.e., 7 years after the smelter closedown).

Data from 230 agricultural crops and 79 homegrown vegetable samples, collected before 2003 (Douay et al. 2008b; Pruvot et al. 2006), were selected on soils with the same degree of Cd and Pb contamination as those selected in the present study. In 2010, a sampling campaign around the smelter was carried out, where (1) the same cultivars were used as in 2003 for the homegrown vegetables (except for leek) and (2) for all crop samples, the same methods for sampling, sample preparation and analyses were used.

Figure 3 presents the proportion of vegetables that were noncompliant with the legislation limits (by considering Cd and Pb together) before and 7 years after the smelter closedown.

Before the smelter closedown, 89, 76, 42, and 40 % of the wheat grain, barley grain, maize grain, and potato samples, respectively, were over the European legislation limit values for foodstuffs. Seven years after the smelter closedown, 72, 71, 10, and 50 % of the samples were over the foodstuff limit values. For feedstuffs, no grain samples exceeded the legislation limits before and 7 years after the smelter closedown, except for the barley grain samples, with only 6 % over the limit values before 2003. However, for wheat and barley straw and foraged maize, 76, 56, and 79 % of the samples, respectively, were over the legislation limits before the closedown. After the smelter closedown, only 28 and 40 % of the wheat straw and foraged maize samples, respectively, were over the feedstuff limit values. Before the smelter closedown, 55, 67, 80, 47, 79, and 92 % of the radish, lettuce,



Fig. 3 Proportion of agricultural crops (foodstuffs and feedstuffs) and homegrown vegetables in compliance with the legislation limits (for both Cd and Pb) before the smelter closedown (2003; Douay et

al. 2008b; Pruvot et al. 2006) and 7 years after the smelter closedown (2010; this study)

carrot, potato, leek, and tomato samples, respectively, were over the European limit values for human consumption. Seven years after the closedown, 68, 66, 93, 90, 73, and 29 % of the samples were over the limit values.

Seven years after the smelter closedown, the results showed that (1) little change or a slight decrease in the proportion of agricultural foodstuffs were noncompliant with the legislation limits, which indicates a slight decrease in the foodstuff metal concentrations; (2) a noticeable decrease in the metal concentrations (mainly Pb concentrations) in feedstuff agricultural crops; and (3) little change or an increase in the homegrown vegetable metal concentrations.

For the agricultural crops, the decrease in plant contamination seemed to result from the decrease in dust fallout, which indicates that the smelter dust emissions played an important role in the Pb contamination of crops. Indeed, the contamination pathways for the plants resulted from root uptake but also from dust deposition on the foliar system (Douay et al. 2008b; Moolenaar and Lexmond 1999; Uzu et al. 2010). Dalenberg and Van Driel (1990) found that direct atmospheric deposition contributed considerably (up to 95 %) to Pb concentrations in wheat grain and straw. However, the decrease in Pb concentrations observed should be treated with caution because various parameters could have an influence when comparing before and 7 years after the smelter closedown. Because of crop rotations and management practices (e.g., changing land use to increase profitability), the agricultural crop samples, collected in the present study, were not exactly the same cultivars as those collected before 2003, and many authors have shown that the accumulation of metals in plants varied not only according to the element, its speciation, the physicochemical parameters of the soils, and the vegetable species but also the type of vegetable cultivar (Banat et al. 2005; Cobb et al. 2000; Georgieva et al. 1997; Tokalioglu and Kartal 2003). These results point out (1) the importance of interrupting atmospheric fallout in the crop contamination pathways for Pb and (2) that after a period of 7 years, natural attenuation of the metal's bioavailability alone may not be sufficient to explain the observed decrease.

For the homegrown vegetables, the smelter closedown did not result in a noticeable decrease in the (sample) metal concentrations (except for tomato), but in an increase in the radish, carrot, and potato metal concentrations. However, comparing the two sets of data was difficult because of the great variability of metal soil contamination between and within the gardens; this was even more problematic since, before 2003, only one composite soil sample was collected to provide an estimate of average soil concentration in each garden.

Seven years after the smelter closedown, agricultural crops did not meet compliance standards for Cd, while homegrown vegetables were noncompliant for both Cd and Pb, which can be explained by the

different contamination levels in urban soils and agricultural soils and the high heterogeneity and variability of the physicochemical parameters (e.g., organic matter) in urban soils (Karapanagiotis et al. 1991; Martinez and Motto 2000). Kitchen garden soils' high organic matter contents stem from gardening practices using local composts from contaminated green wastes. In spite of organic matter, which is responsible for the formation of stable complexes with Pb, the intensification of cultural practices in the kitchen gardens could lead to increasing the mobility and phytoavailability of this element. Indeed, the application of acidic fertilizers and pesticides and frequent plowing generate a more oxidizing environment, which favors Pb mobilization in soils (Spuller et al. 2007) with its release from decomposing soil organic matter (Klitzke and Lang 2009).

Conclusions

After more than a century of activity, and 7 years after the Metaleurop Nord closedown, the agricultural and urban topsoils located around the smelter were strongly contaminated by Cd, Pb, and Zn, at a level much greater than the regional values. The kitchen garden topsoils were more polluted than the agricultural soils, with a great variability of metal concentrations in soils within the gardens studied. This observed heterogeneity, at a relatively short distance from the smelter, could have important implications for assessing local inhabitants' exposure to the metals studied as well as investigations of remediation techniques.

This study showed that the Metaleurop Nord closedown had an effect on the Cd and Pb concentrations of agricultural crops. However, a large share of these crops used for foodstuffs did not comply with the European legislation. For feedstuffs, most samples (except for some wheat straw and foraged maize samples) did not exceed the Cd and Pb legislation limits, suggesting that feedstuffs may be a possible opportunity for most agricultural produce. Seven years after the smelter closedown, a considerable proportion of the vegetables produced in kitchen gardens did not comply with the European foodstuff legislation.

The consumption of kitchen garden produce might contribute to exposing the population to metals. Seven years after the smelter closedown, the high contamination level of the surrounding soils continues to indicate a risk for the environment and the health of the local population. A further investigation (part 2; Pelfrêne et al. 2012) is needed to assess the associated potential health risk to local inhabitants through consumption of homegrown vegetables and ingestion of soil particles by estimating site-specific human health assessment criteria for Cd and Pb.

Acknowledgements The authors wish to thank the farmers and gardeners who participated in the investigations. The present study, realized for ADEME (French Agency for the Environment and Energy Management), was also supported by a grant from the Région Nord – Pas de Calais.

References

- Alexander, P. D., Alloway, B. J., & Dourado, A. M. (2006). Genotypic variations in the accumulation of Cd, Cu, Pb and Zn exhibited by six commonly grown vegetables. *Environmental Pollution*, 144, 736–745.
- Alloways, B. J., & Ayres, D. C. (1997). Chemical principles of environmental pollution (2nd ed.). London: Blackie.
- Alam, M. G. M., Snow, E. T., & Tanaka, A. (2003). Arsenic and heavy metal contamination of vegetables grown in Samta village, Bangladesh. *Science of the Total Environment*, 308, 83–96.
- Antonious, G. F., & Snyder, C. J. (2007). Accumulation of heavy metals in plants and potential phytoremediation of lead by potato, *Solanum tuberosum L. Journal of Environmantal Sicence and Health*, 42, 811–816.
- Arrouays, D., Mench, M., Amans, V., & Gomez, A. (1996). Short-range variability of fallout Pb in a contaminated soil. *Canadian Journal of Soil Science*, 76, 73–81.
- Banat, K. M., Howari, F. M., & Al Hamad, A. A. (2005). Heavy metals in urban soils of central Jordan: Should we worry about their environmental risks? *Environmental Research*, 97, 258–273.
- Bermudez, G. M. A., Jasan, R., Pla, R., & Pignata, M. L. (2011). Heavy metal and trace element concentrations in wheat grains: assessment of potential non-carcinogenic health hazard through their consumption. *Journal of Hazardous Materials*, 193, 264–271.
- Cobb, G. P., Sands, K., Waters, M., Wixson, B. G., & DorwardKing, E. (2000). Accumulation of heavy metals by vegetables grown in mine wastes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 600–607.
- Cui, Y. L., Zhu, Y. G., Zhai, R. H., Chen, D. Y., Huang, Y. Z., Qiu, Y., & Liang, J. Z. (2004). Transfer of metals from soil to vegetables in an area near a smelter in Nanning, China. *Environmental International*, 30, 785–791.
- Dalenberg, J. W., & Van Driel, W. (1990). Contribution of atmospheric deposition to heavy-metals concentrations in field crops. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, 38, 369–379.
- Douay, F., Pruvot, C., Roussel, H., Ciesielski, H., Fourrier, H., Proix, N., & Waterlot, C. (2008a). Contamination of urban soils in an area of northern France polluted by dust

emissions of two smelters. *Water, Air, and Soil Pollution,* 188, 247–260.

- Douay, F., Roussel, H., Pruvot, C., & Waterlot, C. (2008b). Impact of a smelter closedown on metal contents of wheat cultivated in the neighbourhood. *Environmental Science* and Pollution Research, 15, 162–169.
- Douay, F., Roussel, H., Pruvot, C., Loriette, A., & Fourrier, H. (2008c). Assessment of a remediation technique using the replacement of contaminated soils in kitchen gardens nearby a former lead smelter in northern France. *Science of the Total Environment*, 401, 29–38.
- Douay, F., Pruvot, C., Waterlot, C., Fritsch, C., Fourrier, H., Loriette, A., Bidar, G., Grand, C., de Vaufleury, A., & Scheifler, R. (2009). Contamination of woody habitat soils around a former lead smelter in the North of France. *Science of the Total Environment*, 407, 5564–5577.
- Dudka, S., Piotrowska, M., Chlopecka, A., & Witek, T. (1995). Trace metal contamination of soils and crop plants by the mining and smelting industry in Upper Silesia, South Poland. Journal of Geochemical Exploration, 52, 237–250.
- Dudka, S., Piotrowska, M., & Terelak, H. (1996). Transfer of cadmium, lead, and zinc from industrially contaminated soil to crop plants: a field study. *Environmental Pollution*, 94, 181–188.
- European Commission (2006). Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs.
- Flemming, G. A., & Parle, P. J. (1977). Heavy metals in soils, herbage and vegetables from an industrialised area west of Dublin city. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 16, 35–48.
- Finster, M. E., Gray, K. A., & Binns, H. J. (2004). Lead levels of edibles grown in contaminated residential soils: a field survey. *Science of the Total Environment*, 320, 245–257.
- Frangi, J. P., & Richard, D. (1997). Heavy metal soil pollution cartography in northern France. *Science of the Total Envi*ronment, 205, 71–79.
- Georgieva, V., Tasev, C., & Sengalevitch, G. (1997). Growth, yield, lead, zinc, and cadmium content of radish, pea and pepper plants as influenced by level of single and multiple contamination of soil. III. Cadmium. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 23, 12–23.
- Godin, P., Feinberg, M., & Ducauze, C. (1985). Modelling of soil contamination by airborne lead and cadmium around several emission sources. *Environmental Pollution*, 10, 97–114.
- Golia, E. E., Dimirkou, A., & Mitsios, I. K. (2008). Influence of some parameters on heavy metals accumulation by vegetables grown in agricultural soils of different soil orders. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 81, 80–84.
- Hough, R. L., Breward, N., Young, S. D., Crout, N. M. J., Tye, A. M., Moir, A. M., & Thornton, I. (2004). Assessing potential risk of heavy metal exposure from consumption of home-produced vegetables by urban populations. *Envi*ronmental Health Perspectives, 112, 215–221.
- Jarup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. British Medical Bulletin, 68, 167–182.
- Kabata-Pendias, A., & Mukherjee, A. B. (2007). Trace elements from soil to human. New York: Springer.
- Kachenko, A. G., & Singh, B. (2006). Heavy metals contamination in vegetables grown in urban and metal smelter

contaminated sites in Australia. Water, Air, and Soil Pollution, 169, 101–123.

- Karapanagiotis, N. K., Sterritt, R. M., & Lester, J. N. (1991). Heavy metal complexation in sludge-amended soils. The role of organic matter in metal retention. *Environmental Technology*, 12, 1107–1116.
- Khan, S., Cao, Q., Zheng, Y. M., Huang, Y. Z., & Zhu, Y. G. (2008). Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China. *Environmental Pollution*, 152, 686–692.
- Klitzke, S., & Lang, F. (2009). Mobilization of soluble and dispersible lead, arsenic, and antimony in a polluted, organic-rich soil—effects of pH increase and counterion valency. *Journal of Environmental Quality*, 38, 933–939.
- Lehoczky, É., Szabó, L., & Horváth, S. (1998). Cadmium uptake by lettuce in different soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 29, 1903–1912.
- Leroyer, A., Nisse, C., Hemon, D., Gruchociak, A., Salomez, J. L., & Haguenoer, J. M. (2000). Environmental lead exposure in a population of children in northern France: factors affecting lead burden. *American Journal of Industrial Medicine*, 38, 281–289.
- Leroyer, A., Hemon, D., Nisse, C., Auque, G., Mazzuca, M., & Haguenoer, J. M. (2001). Determinants of cadmium burden levels in a population of children living in the vicinity of non-ferrous smelters. *Environmental Research*, 87, 147– 159.
- Li, Y., Wang, Y. B., Gou, X., Su, Y. B., & Wang, G. (2006). Risk assessment of heavy metals in soils and vegetables around non-ferrous metals mining and smelting sites, Baiyin, China. *Journal of Environmental Sciences*, 18, 1124–1134.
- Liu, H. Y., Probst, A., & Liao, B. H. (2005). Metal contamination of soils and crops affected by the Chenzhou lead zinc mine spill (Hunan, China). *Science of the Total Environment*, 339, 153–166.
- Long, X. X., Yang, X. E., Ni, W. Z., Ye, Z. Q., He, Z. L., Calvert, D. V., & Stoffella, J. P. (2003). Assessing zinc thresholds for phytotoxicity and potential dietary toxicity in selected vegetable crops. *Communications in Soil Science and Plant Physiology*, 34, 1421–1434.
- Machemer, S. D., & Hosick, T. J. (2004). Determination of soil lead variability in residential soil for remediation decision making. *Water, Air, and Soil Pollution*, 151, 305–322.
- Martinez, C. E., & Motto, H. L. (2000). Solubility of lead, zinc and copper added to mineral soils. *Environmental Pollution*, 107, 153–158.
- McBride, M. B. (2003). Toxic metals in sewage sludgeamended soils: has promotion of beneficial use discounted the risks? *Advances in Environmental Research*, 8, 5–19.
- McBride, M. B. (2007). Trace metals and sulfur in soils and forage of a chronic wasting disease locus. *Environmental Chemistry*, 4, 134–139.
- McLaughlin, J. M., Maier, A. N., Rayment, E. G., Sparrow, A. L., Berg, G., McKay, A., Milham, P., Merry, H. R., & Smart, K. M. (1997). Cadmium in Australian potato tubers and soils. *Journal of Environmental Quality*, 26, 1644– 1649.
- Moolenaar, S. W., & Lexmond, T. H. (1999). Heavy metal balances, part I: general aspects of cadmium, copper, zinc, and lead balance studies in agro-ecosystems. *Journal of Industrial Ecology*, 2, 45–60.

- Nabulo, G., Young, S. D., & Black, C. R. (2010). Assessing risk to human health from tropical leafy vegetables grown on contaminated urban soils. *Science of the Total Environment*, 408, 5338– 5351.
- Oliver, M. A. (1997). Soil and human health: a review. European Journal of Soil Science, 48, 573–592.
- Pelfrêne, A., Douay, F., Richard, A., Roussel, H., & Girondelot, B. (2012). Assessment of potential health risk for inhabitants living near a former lead smelter. Part 2: site-specific human health risk assessment of Cd and Pb contamination in kitchen gardens. *Environmental Monitoring and Assessment.* doi:10.1007/s10661-012-2767-x.
- Pruvot, C., Douay, F., Fourrier, H., & Waterlot, C. (2006). Heavy metals in soil, crops and grass as a source of human exposure in the former mining area. *Journal of Soils and Sediments*, 6, 215–220.
- Rafiq, N., Maqsood, Z. T., & Parveen, Z. (2006). Lead and cadmium in wheat grain. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 76, 1044–1052.
- Spuller, C., Weigand, H., & Marb, C. (2007). Trace metal stabilization in a shooting range soil: mobility and phytotoxicity. *Journal of Hazardous Materials*, 141, 378–387.
- Srek, P., Hejcman, M., & Kunzova, E. (2010). Multivariate analysis of relationship between potato (*Solanum tuber*osum L.) yield, amount of applied elements, their concentrations in tubers and uptake in a long-term fertilizer experiment. *Field Crops Research*, 118, 183–193.
- State Quality Monitoring, Inspecting, and Quarantining Administration of China (SQMIQAC) (2001). Safety qualification for agricultural products—safety requirements for nonenvironmental pollution vegetable (GB 18406.1-2001).
- Sterckeman, T., Douay, F., Proix, N., & Fourrier, H. (2000). Vertical distribution of Cd, Pb and Zn in soils near smelters in the North of France. *Environmental Pollution*, 107, 377–389.
- Sterckeman, T., Douay, F., Proix, N., Fourrier, H., & Perdrix, E. (2002). Assessment of the contamination of cultivated soils

by eighteen trace elements around smelters in the North of France. *Water, Air, and Soil Pollution, 135*, 173–194.

- Sterckeman, T., Douay, F., Baize, D., Fourrier, H., Proix, N., & Schvartz, C. (2006). Trace elements in soils developed in sedimentary materials from Northern France. *Geoderma*, 136, 912–929.
- Tokalioglu, S., & Kartal, S. (2003). Relationship between vegetable metal and soil-extractable metal contents by the BCR sequential extraction procedure: chemometrical interpretation of the data. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry*, 83, 935–952.
- Uzu, G., Sobanska, S., Sarret, G., Munoz, M., & Dumat, C. (2010). Foliar lead uptake by lettuce exposed to atmospheric fallouts. *Environmental Science & Technology*, 44, 1036–1042.
- Voutsa, D., Grimanis, A., & Samara, C. (1996). Trace elements in vegetables grown in an industrial area in relation to soil and air particulate matter. *Environmental Pollution*, 94, 325–335.
- Wang, X., Sato, T., Xing, B., & Tao, S. (2005). Health risks of heavy metals to the general public in Tianjin, China via consumption of vegetables and fish. *Science of the Total Environment*, 350, 28–37.
- Wang, G., Su, M. Y., Chen, Y. H., Lin, F. F., Luo, D., & Gao, S. F. (2006). Transfer characteristics of cadmium and lead from soil to the edible parts of six vegetable species in southeastern China. *Environmental Pollution*, 144, 127– 135.
- Weber, R., & Hrynczuk, B. (2000). Effect of leaf and soil contaminations on heavy metals content in spring wheat crops. *Nukleonika*, 45, 137–140.
- Zhuang, P., McBride, M. B., Xia, H., Li, N., & Li, Z. (2009). Health risk from heavy metals via consumption of food crops in the vicinity of Dabaoshan mine, South China. *Science of the Total Environment*, 407, 1551–1561.

II.3.2. Bioaccessibilité orale des métaux dans les légumes et influence du mode de cuisson

De façon générale, l'accumulation des métaux dans les plantes varie selon l'élément, sa spéciation, les paramètres physico-chimiques des sols, les espèces cultivées, les variétés et les organes (racine, tige, feuille, fruit). A ces transferts sol/plantes, s'ajoute en milieu industriel une contamination en lien avec les dépôts de particules contaminées sur les organes aériens (Douay et al., 2001b ; Uzu et al., 2009). Bien que les émissions atmosphériques aient cessé avec l'arrêt de Metaleurop Nord, cette voie de contamination des plantes n'est pas à exclure du fait simplement du réenvol de particules de sol contaminées (Douay et al., 2005).

Pour poser un réel diagnostic de l'exposition des populations en lien avec la consommation de légumes autoproduits, la concentration en métaux des végétaux consommés est une information importante mais reste toutefois insuffisante. C'est pourquoi, en vue de mieux évaluer cette exposition, mes travaux de recherche ont porté sur : (1) la détermination de la bioaccessibilité orale de Cd, Pb et Zn dans les 7 légumes considérés dans les 34 potagers étudiés aux alentours de l'ancienne fonderie (*cf* § II.3.1) et (2) l'étude de l'influence de différents modes de préparation et de cuisson des légumes sur la bioaccessibilité des métaux [6, 29, 51]. Au total, 208 échantillons de légumes ont été considérés (35 de radis, 33 de laitue, 32 de haricot vert, 30 de pomme de terre, 28 de carotte, 24 de tomate, 26 de poireau). Pour les échantillons de carotte, haricot vert, poireau et pomme de terre, deux lots ont été constitués : le premier lot sans cuisson (échantillons crus) et le second lot avec cuisson (à la vapeur et à la friture). J'ai ainsi réalisé le test UBM sur les 323 échantillons de légumes crus et/ou cuits.

II.3.2.1. Cas du cadmium

La méthodologie et les résultats obtenus sur Cd ont fait l'objet d'une publication [6] insérée cidessous.

Pelfrêne A., Waterlot C., Guerin A., Proix N., Richard A., Douay F., 2015. Use of an in vitro digestion method to estimate human bioaccessibility of Cd in vegetables grown in smelter-impacted soils: the influence of cooking. Environmental Geochemistry and Health 37, 767-778.

En résumé...

La bioaccessibilité orale de Cd a été évaluée au moyen du test UBM dans les 7 légumes (radis, laitue, haricot vert, carotte, poireau, tomate et pomme de terre) cultivés sur les 34 sols de potagers situés sur le site atelier Metaleurop. Ont été considérés les légumes crus et/ou cuits. Dans ce contexte de contamination, la bioaccessibilité de Cd est dépendante de la concentration mesurée dans les végétaux ($R^2 = 0,99$). Une forte quantité de Cd des légumes crus est mobilisée pendant le processus de digestion (en moyenne 85% dans la phase G et 69% dans la phase GI), ce qui peut être attribué à une forte accumulation de cet élément durant la croissance des végétaux. Ce métal pourrait être principalement accumulé dans les vacuoles des cellules végétales, et donc beaucoup moins absorbé au niveau de la paroi cellulaire, permettant ainsi à Cd d'être facilement solubilisé. La cuisson à la vapeur, tandis que la friture entraîne une diminution importante de Cd bioaccessibile dans les deux phases.

ORIGINAL PAPER



Use of an in vitro digestion method to estimate human bioaccessibility of Cd in vegetables grown in smelterimpacted soils: the influence of cooking

Aurélie Pelfrêne · Christophe Waterlot · Annie Guerin · Nicolas Proix · Antoine Richard · Francis Douay

Received: 30 October 2014/Accepted: 27 January 2015/Published online: 7 February 2015 © Springer Science+Business Media Dordrecht 2015

Abstract Metal contamination of urban soils and homegrown vegetables has caused major concern. Some studies showed that cadmium (Cd) was among the most significant hazards in kitchen garden soils and prolonged exposure to this metal could cause deleterious health effects in humans. In general, most risk assessment procedures are based on total concentrations of metals in vegetables. The present study assesses human bioaccessibility of Cd in vegetables cultivated in smelter-impacted kitchen garden soils. Seven vegetables (radish, lettuce, French bean, carrot, leek, tomato, and potato) were considered. Using the UBM protocol (unified BARGE bioaccessibility method), the bioaccessibility of Cd was measured in raw/cooked vegetables. A considerable amount of Cd was mobilized from raw vegetables during the digestion process (on average 85 % in the gastric phase and 69 % in the gastrointestinal phase), which could be attributed to a high uptake of Cd during the growth of the vegetables. Most Cd is accumulated in the vacuoles of plant cells, except what is absorbed by the cell wall, allowing Cd to be

A. Pelfrêne (⊠) · C. Waterlot · F. Douay
ISA Lille, Laboratoire Génie Civil et géo-Environnement (LGCgE), 48 boulevard Vauban,
59046 Lille Cedex, France
e-mail: aurelie.pelfrene@isa-lille.fr

A. Guerin · N. Proix · A. Richard Laboratoire d'Analyse des Sols, Institut National de la Recherche Agronomique, 273 rue de Cambrai, 62000 Arras, France released from plant tissues under moderate conditions. Cooking by the steaming process generally increased the bioaccessibility of Cd in French bean, carrot, and leek. For potato, few or no significant differences of Cd bioaccessibility were observed after the steaming process, while the frying process strongly decreased bioaccessibility in both phases. The estimation of metal bioaccessibility in vegetables is helpful for human health risk assessment.

Keywords Contaminated soil · Cadmium · Bioaccessibility · Vegetable · Cooking methods · In vitro digestion

Introduction

Metal contamination of urban soils has caused major concern and can pose significant direct risks to human health through direct ingestion of soil particles, inhalation of dust, and consumption of food plants grown in metal-contaminated soils (Cambra et al. 1999). Studies have shown that cadmium (Cd) was among the most significant hazards in kitchen garden soils (Alloway 2004; Alexander et al. 2006; Swartjes et al. 2013) and prolonged exposure to this metal could cause deleterious health effects in humans (Reilly 1991; Oliver 1997; Jarup 2003; Asagba 2009). In this context, the major route of exposure of humans to Cd is via the consumption of vegetables homegrown on highly Cd-contaminated soils (Millis et al. 2004). In general, most risk assessment procedures are based on total concentrations of metals in the vegetables. However, this content does not always reflect the amount that is available to the consumer. Therefore, there is a need to determine the oral bioavailability of metals in vegetables to assess the human health risk. To become bioavailable, contaminants must first be released from the food during the digestion process (i.e., become bioaccessible). Oral bioaccessibility is defined as the fraction of contaminant that is released from the food matrix in the gastrointestinal tract and becomes available for absorption, i.e., enters the blood stream (Oomen et al. 2002). The process includes several transformations of food during digestion phases, i.e., the salivary, gastric, and intestinal phases. Thus, to accurately assess the oral exposure risk, the most critical issue is bioaccessibility, whose evaluation has acquired special importance in recent years. Several in vitro models have been proposed and used to study the bioaccessibility in food of a great variety of nutrient compounds (tocopherols, fatty acids, carotenoids, and vitamins-e.g., Millis et al. 2004; Jiwan et al. 2010; Etcheverry et al. 2012; Knockaert et al. 2012-and chemical compounds [metal(loid)s, polycyclic aromatic hydrocarbons, organochlorine pesticides, and phenols-e.g., Hemery et al. 2010; Wang et al. 2011; Kruger et al. 2013]. With regard to toxic trace elements in food, most bioaccessibility studies have concentrated on seaweed, rice, cereals, and seafood products (He et al. 2010; Houlbrèque et al. 2011; García-Sartal et al. 2011; Maulvault et al. 2011; Ouédraogo and Amyot 2011; Signes-Pastor et al. 2012; Koch et al. 2013). Only a few studies have investigated the bioaccessibility of metals in vegetables (Intawongse and Dean 2008; Moreda-Pineiro et al. 2011; Fu and Cui 2013; Hu et al. 2013).

Food may be ingested raw and/or after various cooking treatments (such as boiling, steaming, frying, or grilling). Several studies showed that these processes generally change the bioaccessibility of various compounds from food, in particular from seafood products (Cabanero et al. 2004; Amiard et al. 2008; He et al. 2010; Houlbrèque et al. 2011; Maulvault et al. 2011; Ouédraogo and Amyot 2011), but there is little information concerning the influence of different cooking treatments on the bioaccessibility of metals in vegetables (Fu and Cui 2013).

In the north of France, soil quality is a major concern, especially in the former coal mining area, due to the past industrial context and strong demographic pressure (about 600 inhabitants per km²). In this area, the emissions generated by the former Metaleurop Nord lead (Pb) smelter have severely contaminated the surrounding soils (Sterckeman et al. 2000, 2002). After more than a century of activity, and 7 years after the Metaleurop Nord smelter closed down, the urban topsoils located around this former smelter are severely contaminated by Cd and Pb, and a high percentage of the vegetables produced in the kitchen gardens of the surrounding area do not comply with the European foodstuff legislation (Douay et al. 2013). Excessive accumulation of Cd and Pb in these soils is of great concern because of the potential health risk to the local inhabitants through ingestion and/or inhalation of soil particles and consumption of vegetables. In a previous study, Pelfrêne et al. (2013a) focused on estimating the potential level of human health risks associated with chronic exposure to Cd and Pb in kitchen garden soils through ingestion of soil particles and consumption of homegrown vegetables. Radish, lettuce, French bean, carrot, leek, tomato, and potato are very common crops and widely consumed vegetables in northern France. Pelfrêne et al. (2013a) measured the total Pb and Cd concentrations in these vegetables cultivated in these kitchen garden soils. They found that the Pb in the vegetables had a negligible contribution to the estimated daily intake of this metal for humans, while the Pb levels in the soils studied were the cause of a relatively high health risk through soil particle ingestion. On the other hand, the Cd in the vegetables considered had a high contribution to the estimated daily intake of Cd for humans, in particular for children.

With regard to these previous results and because there is a lack of information on the bioaccessibility of Cd in vegetables based on in vitro digestion, the aims of the present study were to (a) determine the bioaccessibility of Cd in the raw form of these seven vegetables and (b) study the influence of cooking on Cd bioaccessibility.

Materials and methods

Sampling, preparation, and chemical analysis of vegetables

The homegrown vegetables were collected in 34 kitchen gardens located in residential areas in the
vicinity of the former Metaleurop Nord smelter (Douay et al. 2013). The main vegetables produced and selected for this study were radish (*Raphanus* sativus L.), lettuce (*Lactuca sativa* L.), French bean (*Phaseolus vulgaris* L.), carrot (*Daucus carota* L.), leek (*Allium porrum* L.), tomato (*Solanum lycoper*sicum L.), and potato (*Solanum tuberosum* L.). The gardeners received the same cultivars (seeds and seedlings) in order to reduce variability in metal accumulation within species and grew all the vegetables themselves.

A composite and representative sample of each vegetable was sampled at its consumption stage. Because of gardening crop failures, certain vegetable samples were missing in some kitchen gardens. Therefore, a total of 177 samples were collected and packed in polyethylene bags. The samples were prepared as a careful consumer would prepare them to eat, with the elimination of the inedible parts and meticulous cleaning in three successive washings of tap water. All precautious were taken to avoid possible contamination.

The edible portion was divided into three samples that were kept raw (all vegetables), steamed (only French bean, carrot, leek, and potato), or fried (only potato). Raw vegetables were cut into small pieces to obtain a representative sample. The steaming process was carried out in a steam cooker using tap water. Frying was done in a deep fryer using sunflower oil. The temperature of oil during the frying process was 180–190 °C. Raw and cooked vegetables were freezedried and then crushed with a cutting mill in tungsten carbide with a 0.5-mm grid. Subsamples of raw, steamed, and fried vegetables were then digested with concentrated nitric acid (70 %) and hydrogen peroxide (30 %) using a closed microwave in order to measure the total Cd concentrations in the vegetables.

The concentrations of Cd in vegetables were quantified by the INRA Soil Analysis Laboratory (Arras, France) accredited by COFRAC (French Committee of Accreditation) according to the ISO 17025 standard. The high concentrations of Cd were measured by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICPOES, Vista Pro, Varian, France), and the low concentrations ($<2 \text{ mg kg}^{-1}$) were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS, Série X2, Thermo, France). The results were expressed on fresh and dry weight basis (FW and DW, respectively).

In vitro digestion protocol

The bioaccessibility test was performed according to the unified bioaccessibility method (UBM; Wragg et al. 2011). This test was widely described and used by several authors in relation to ingestion of contaminated soil particles (Denys et al. 2008; Broadway et al. 2010; Roussel et al. 2010; Okorie et al. 2011; Pelfrêne et al. 2011a, b, 2012; Barsby et al. 2012; Cox et al. 2013). This method may be extended to sediments, vegetables, dusts, ashes, or any other matrix studied in an exposure assessment approach. Recently, the UBM protocol has been applied to the determination of metal contents in nutritional supplement samples (Tokalioğlu et al. 2014).

This test consists of a three-step procedure simulating the digestive processes in the mouth, stomach, and small intestine (Pelfrêne et al. 2011a, b, 2012). The prepared raw and cooked vegetable samples (0.6 g of dried plant material) were placed in a tube and mixed with 9 mL of simulated saliva and 13.5 mL of simulated gastric solution (adjusted to a pH of 1.2 ± 0.05). The tubes were shaken end-over-end at 37 °C for 1 h. After centrifugation, supernatants were removed and filtered through a 0.45-µm filter disk for analysis. The first stage constituted the gastric-only phase of the extraction technique. To simulate the gastric and intestinal phases together, 27 mL of simulated duodenal fluid and 9 mL of simulated bile solution were added to the gastric solution after raising the pH to 6.3 \pm 0.05. The samples were then placed in the shaking incubator at 37 °C for 4 h. After centrifugation, the resulting supernatants were removed and filtered for analysis. The second stage constituted the gastrointestinal phase of the extraction technique. The Cd concentrations on the bioaccessibility extracts were measured using ICPMS.

In this experiment, each treatment had two replicates, and bioaccessibility was expressed as a percentage and defined as the solubility of Cd in the simulated gastric or gastrointestinal solution divided by the total concentration of Cd in the vegetable. The quality control of the measurements was done by measuring a blank and a NIST standard reference material (SRM 2710a) with each analytical batch. Mean recoveries in the reference material (n = 21) ranged from 93 to 103 % in the gastric phase and from 92 to 108 % in the gastrointestinal phase.

Statistical analyses

Statistical analysis of the data was performed using XLSTAT 2013.5.09 (Addinsoft). All data distributions were checked for normality and homogeneity of variances. One-way analysis of variance (ANOVA) was done for data that met the conditions of normal distribution and homogeneous variances, and the Tukey test was used for multiple mean comparisons. Data with a distribution deviating from normality were analyzed with the Kruskal–Wallis test. A probability level of p < 0.05 was chosen to establish statistical significance.

Results and discussion

Total concentrations of Cd in raw homegrown vegetables with regard to the contamination degree of soils

The homegrown vegetables were collected in 34 kitchen garden soils with a wide range of Cd contamination from 4 to 20 mg of Cd per kg of soil (Douay et al. 2013). Table 1 shows the total and bioaccessible Cd concentrations in plant samples with regard to the topsoil Cd contamination. Four levels of soil contamination were discriminated: 4–6 (mean 4.6; level 1), 6–8 (mean 7.1; level 2), 8–11 (mean 9.9; level 3), and 13–20 (mean, 14.4; level 4) mg of Cd per kg of soil.

On the whole, for all levels studied, the results showed that the highest concentrations of Cd in the vegetables were obtained in lettuce, and to a lesser extent, in radish, leek, carrot, potato, and tomato, while the lowest concentrations were measured in French bean. The order of accumulation and the mean concentrations of metals measured in lettuce, carrot, and French bean were comparable with values published by Alexander et al. (2006). Compared with the values recorded by Voutsa et al. (1996), the concentrations of Cd in carrot, leek, and lettuce were higher or similar. For example, in the present study, the Cd concentrations in carrot varied from 0.45 to 3.97 mg kg⁻¹, while in Voutsa et al. (1996), the values varied from 0.17 to 0.41 mg kg⁻¹, for comparable Cd levels in soils.

Bešter et al. (2013) provided evidence that the most significant parameter for influencing the Cd concentration in vegetables was the concentration of Cd in soil. In the present study (Table 1), when the concentration of Cd in soil was increased from level 1 to level 4, there was an increase in Cd concentrations in radish, potato, carrot, leek, and tomato. It is interesting to note that the increase in Cd concentrations was moderately lower in carrot, leek, and tomato than in radish and potato, which could indicate different physiological mechanisms (e.g., exclusion and compartmentation; Iqbal Lone et al. 2008) that prevent some vegetable species from excessive Cd accumulation (Table 1). Lettuce is a relatively high accumulator of Cd, while French bean appears to be a relatively low accumulator. However, no significant differences in Cd concentrations were found in lettuce and French bean with regard to the contamination levels of soils (Table 1). French bean could be a suitable species to grow on these soils given the results suggest minimal differences in uptake across the four levels of soil contamination. However a more detailed human health risk assessment would be required before such a recommendation could be adopted. With lettuce, the standard deviation values were very high for each level, which indicates the high heterogeneity and variability of Cd concentrations, which could be explained by a foliar contamination (Uzu et al. 2010).

Bioaccessible concentrations of Cd in raw homegrown vegetables

The oral bioaccessible concentrations of Cd (expressed in mg kg^{-1} DW) measured in the gastric and gastrointestinal fractions defined by the UBM procedure are reported in Table 1 for the seven homegrown vegetables with regard to the contamination levels of soils. The data are also presented as a percentage of total Cd concentrations measured in the vegetables in relation to the four contaminant levels in the soils. The results showed that the variation in the concentrations of Cd in soils has the same impact on bioaccessibility values (expressed in mg kg^{-1} DW) than on total concentrations in vegetables, e.g., the total Cd concentrations in some vegetables increased with the soil total Cd concentrations. More specifically, when the concentration of Cd in soil was increased from level 1 to level 4, (a) there was a significant increase in Cd bioaccessibility in radish, potato, carrot, leek, and tomato and (b) no significant differences in Cd bioaccessibility were found in lettuce and French bean due to the high standard deviation of the values for the four levels (Table 1).

One of the factors potentially affecting the bioaccessibility is the level of contamination in the matrix **Table 1** Total and oral bioaccessible Cd (in the gastric phase, G, and the gastrointestinal phase, GI) concentrations in radish, lettuce, French bean, carrot, potato, leek, and tomato according

to the contamination degree (levels 1-4) of topsoils (all data reported as dry weight)

	Total Cd by acid digestion Mean \pm SD (mg kg ⁻¹)	UBM test				
		G		GI		
		Mean \pm SD	_	Mean \pm SD		
		$(mg kg^{-1})$	(%)	$(mg kg^{-1})$	(%)	
Radish						
Level 1 $(n = 9)$	1.47 ± 0.85^a	$1.21\pm0.72^{\rm a}$	82.1 ± 4.8	1.00 ± 0.58^a	68.5 ± 3.4	
Level 2 $(n = 7)$	$1.96 \pm 0.72^{a,b}$	$1.63 \pm 0.59^{\rm a,b}$	83.3 ± 2.4	$1.35 \pm 0.53^{a,b}$	68.9 ± 2.8	
Level 3 $(n = 5)$	$3.00 \pm 0.94^{\rm b,c}$	$2.53 \pm 0.77^{\rm b,c}$	84.8 ± 8.1	$2.20 \pm 0.72^{\rm b,c}$	73.1 ± 4.2	
Level 4 $(n = 5)$	$3.95 \pm 1.34^{\circ}$	$3.41 \pm 1.27^{\circ}$	85.3 ± 5.4	$2.87\pm1.08^{\rm c}$	71.8 ± 4.4	
Lettuce						
Level 1 $(n = 10)$	$4.19 \pm 2.44^{\rm a}$	3.70 ± 2.16^{a}	88.1 ± 2.5	2.84 ± 1.65^a	67.5 ± 3.0	
Level 2 $(n = 9)$	5.59 ± 4.99^{a}	5.02 ± 4.46^{a}	89.4 ± 3.8	$3.91 \pm 3.54^{\rm a}$	69.1 ± 5.1	
Level 3 $(n = 4)$	6.54 ± 2.63^{a}	$5.90\pm2.24^{\rm a}$	90.8 ± 3.3	$4.68\pm1.85^{\rm a}$	71.8 ± 2.5	
Level 4 $(n = 4)$	9.25 ± 4.82^a	8.11 ± 4.44^{a}	86.1 ± 5.4	6.14 ± 2.63^a	70.2 ± 10.9	
French bean						
Level 1 $(n = 6)$	0.13 ± 0.13^a	$0.12\pm0.10^{\rm a}$	83.5 ± 7.0	0.15 ± 0.04^a	55.6 ± 7.0	
Level 2 $(n = 9)$	0.12 ± 0.09^{a}	$0.09 \pm 0.07^{\rm a}$	78.7 ± 4.9	$0.14\pm0.05^{\rm a}$	59.0 ± 11.6	
Level 3 $(n = 4)$	0.12 ± 0.03^a	$0.10\pm0.02^{\rm a}$	85.8 ± 7.7	$0.10\pm0.00^{\rm a}$	71.6 ± 0.0	
Level 4 $(n = 6)$	0.18 ± 0.05^a	$0.14\pm0.04^{\rm a}$	80.7 ± 4.7	$0.12\pm0.02^{\rm a}$	66.0 ± 15.4	
Carrot						
Level 1 $(n = 9)$	1.26 ± 0.58^a	$1.08\pm0.49^{\rm a}$	85.0 ± 2.6	$0.87\pm0.43^{\rm a}$	66.9 ± 5.8	
Level 2 $(n = 9)$	$0.93\pm0.34^{\rm a}$	$0.81 \pm 0.28^{\rm a}$	87.7 ± 2.9	$0.67\pm0.22^{\rm a}$	72.6 ± 5.2	
Level 3 $(n = 5)$	$1.95 \pm 0.70^{\rm a,b}$	$1.76 \pm 0.71^{a,b}$	89.3 ± 3.8	$1.45 \pm 0.61^{a,b}$	73.4 ± 5.2	
Level 4 $(n = 5)$	2.67 ± 1.40^{b}	$2.24 \pm 1.21^{\text{b}}$	84.3 ± 4.9	$1.99 \pm 1.09^{\rm b}$	75.8 ± 7.5	
Potato						
Level 1 $(n = 9)$	0.59 ± 0.16^{a}	$0.51\pm0.14^{\rm a}$	86.8 ± 4.8	0.41 ± 0.13^a	69.4 ± 10.9	
Level 2 $(n = 10)$	$0.68 \pm 0.28^{\rm a,b}$	$0.60 \pm 0.24^{\rm a,b}$	87.6 ± 2.4	$0.48 \pm 0.17^{a,b}$	72.4 ± 11.6	
Level 3 $(n = 6)$	$1.06 \pm 0.39^{\rm b,c}$	$0.94 \pm 0.33^{\rm b,c}$	89.1 ± 5.7	$0.73 \pm 0.25^{\rm b,c}$	69.7 ± 9.9	
Level 4 $(n = 5)$	$1.27 \pm 0.36^{\circ}$	$1.14 \pm 0.35^{\rm c}$	89.9 ± 1.9	$0.87\pm0.21^{\rm c}$	69.1 ± 5.5	
Leek						
Level 1 $(n = 8)$	$1.42\pm0.68^{\rm a}$	$1.18\pm0.54^{\rm a}$	84.0 ± 3.2	1.01 ± 0.46^{a}	71.6 ± 5.6	
Level 2 $(n = 4)$	$1.51\pm0.89^{\rm a}$	$1.28\pm0.76^{\rm a}$	84.6 ± 0.7	1.04 ± 0.57^a	70.2 ± 3.1	
Level 3 $(n = 3)$	$2.24 \pm 0.61^{a,b}$	$1.92\pm0.58^{a,b}$	85.4 ± 3.5	$1.60 \pm 0.45^{a,b}$	71.1 ± 1.0	
Level 4 $(n = 2)$	3.39 ± 0.00^{b}	$2.91\pm1.00^{\rm b}$	85.3 ± 3.0	$2.44\pm2.00^{\rm b}$	72.0 ± 4.0	
Tomato						
Level 1 $(n = 7)$	0.55 ± 0.23^a	0.45 ± 0.20^a	81.7 ± 3.4	0.37 ± 0.15^a	68.0 ± 14.9	
Level 2 $(n = 9)$	0.61 ± 0.26^a	$0.50\pm0.23^{a,b}$	81.7 ± 3.5	0.41 ± 0.19^{a}	67.1 ± 7.7	
Level 3 $(n = 5)$	$0.94 \pm 0.23^{a,b}$	$0.80 \pm 0.21^{\rm b,c}$	84.3 ± 3.0	$0.70 \pm 0.21^{\rm b}$	73.1 ± 6.4	
Level 4 $(n = 3)$	1.16 ± 0.17^{b}	$0.94 \pm 0.10^{\circ}$	81.4 ± 3.3	$0.82 \pm 0.11^{\rm b}$	70.3 ± 0.5	

Level 1: 4–6 mg kg⁻¹; Level 2: 6–8 mg kg⁻¹; Level 3: 8–11 mg kg⁻¹; Level 4: 13–20 mg kg⁻¹

Lowercase letters (a–c) denote significant differences (p < 0.05) between the four levels for each homegrown vegetable

considered. In general, a dose-proportional relationship between contamination level and bioaccessibility/bioavailability is taken as a basic assumption. In previous studies on the studied area, a dose-proportional relationship has been found for the contamination level and bioaccessibility of Cd from soil (Roussel et al. 2010; Pelfrêne et al. 2012, 2013a). However, these authors provided evidence that Cd bioaccessibility from soil was also affected by other physicochemical parameters (i.e., total carbonate, organic matter, and P2O5, free Fe-Mn oxide and total Al contents). A dose-proportional relationship for the bioaccessibility and concentrations of Cd in food can be expected (Intawongse and Dean 2008). In the present study, we examined the influence of total Cd concentration measured in raw vegetables on the bioaccessibility of this element (Fig. 1). The bioaccessibility of Cd in both gastric and gastrointestinal phases increased significantly with increasing total concentration whatever vegetable was studied (with R^2 of 0.99 in both phases), which indicates that, in these study conditions, bioaccessibility is totally concentration dependent. A positive correlation was also observed by Intawongse and Dean (2008) from data reported in their study (R^2 of 0.98 and 0.92 in the gastric and gastrointestinal phases, respectively, for lettuce, carrot, radish, and spinach).

Expressed as a percentage of total concentrations in vegetables, the results showed high percentages of Cd bioaccessibility in the gastric and gastrointestinal

phases for all vegetables studied (Table 1), which indicates that a considerable amount of Cd was mobilized from plants during the digestion process. On the whole and on average, (a) Cd bioaccessibility varied from 81 to 89 % in the gastric phase and from 63 to 72 % in the gastrointestinal phase and (b) there were few or no significant differences between the seven vegetables studied. The UBM protocol was widely used by the authors in relation to ingestion of contaminated soil particles in the study area (Roussel et al. 2010; Pelfrêne et al. 2011a, 2013a, b). Comparison of the bioaccessibility of Cd from food versus soil showed a significant effect of the vegetable or soil matrix. The percentage of Cd bioaccessibility from food matrix was from 1.3- to 2.2-fold higher than those from soil matrix (on average, 68 and 32 % in the gastric and gastrointestinal phases, respectively; Pelfrêne et al. 2013b).

The bioaccessibility of Cd from food is controlled by many factors, such as microfibers of crystalline cellulose, phytochelatins, nutritional characteristics, microbial processes, and Cd (species and its speciation) (Mounicou et al. 2002; Maulvault et al. 2011; Sun et al. 2012). Moreover, characteristics of food, enzyme type, and enzyme concentrations are key factors that control the digestion of food during in vitro digestion. According to the in vitro test used, higher enzyme concentrations accelerate digestion or degradation of food components (Hur et al. 2011). In the present study, the UBM protocol used synthetic



Fig. 1 Relationship between total Cd concentrations and oral bioaccessibility (in the gastric phase, G, and the gastrointestinal phase, GI) in all homegrown vegetables studied (n = 177)

digestive juices based on the composition found in human physiology and according to physiological transit times (Oomen et al. 2003, 2006). Most Cd is accumulated in the vacuoles of plant cells, except what is absorbed by the cell wall, so Cd is easily released from plant tissues during in vitro digestion (Hall 2002; Fu and Cui 2013), which explains the high percentages of bioaccessibility observed. In vegetables, Cd has been shown to bind to dietary fibers including cellulose, lignin, and pectin (Waisberg et al. 2004) and to associate with denatured proteins with low solubility and/or with soluble ligands (e.g., metallothionein) (Asagba 2009). Cd in foods such as vegetables exists mainly as Cd-metallothionein complexes or metallothionein-like Cd-binding proteins. These soluble proteins are easily degraded in the digestive tract, thus releasing Cd initially bound in the food (Asagba 2009). In the gastric phase, enzymes (such as pepsin) were able to release most Cd and only a portion was still absorbed into plant tissues (Hur et al. 2011). In the intestinal phase, Cd bioaccessibility was lower than in the gastric phase. However, the values reported were high. These results can be explained by the increase in pH and the addition of pancreatin and bile extract (Fu and Cui 2013). The increase in pH that takes place subsequently during the intestinal stage (from 1.2 ± 0.05 in the gastric phase to 6.3 ± 0.05 in the intestinal phase) might produce precipitation and/or resorption of part of the solubilized Cd. In balance, the decomposition effects of pancreatin on the integrity of the cell wall increased the release of Cd into intestinal juice with a part of Cd that was remaining as insoluble complexes in digestion conditions. Slight but significant differences on bioaccessible fractions were observed between some of the seven vegetables, which could be explained by differences between the cell wall materials of vegetables. Pectin composition and the presence of other polysaccharides (which vary according to the vegetable matrix) in the cell wall may influence the bioaccessibility of metal by interacting differently with the target compounds (Palmero et al. 2013). For example, differences were reported in the literature between carrot and tomato cell wall material. The cell walls in carrot are very fibrous and compact, and pectin may reduce cell wall porosity, while in tomato, cell walls are thinner and less fibrous than in carrot (Jeffery et al. 2012).

Influence of cooking in Cd bioaccessibility

Because the cooking process can alter Cd bioaccessibility from food, two processes were studied, including steaming and frying. The steaming process was carried out on French bean, carrot, leek, and potato and was chosen to limit the amount of water used for cooking and to avoid a potential dilution of elements, especially Cd. Moreover, steaming is considered a healthy cooking technique and results in a more nutritious vegetable than boiling because fewer nutrients are leached away into the water, which is usually discarded. The frying process was carried out on potato samples because it represents the main cooking technique in northern France.

French bean, carrot, and leek

The influence of steaming on Cd bioaccessibility was studied for French bean, carrot, and leek. The average Cd bioaccessibility in cooked vegetables was 84.1, 90.4, and 88.5 % for French bean, carrot, and leek, respectively, in the gastric phase and 66.2, 72.7, and 75.5 %, respectively, in the gastrointestinal phase (Fig. 2). Compared to the data for raw vegetables, the steaming process generally increased the bioaccessibility of Cd in the three vegetables and in both phases of digestion. More specifically, the increase varied from 0.7 to 23%, from 0.5 to 13 %, and from 0.6 to 11 % for French bean, carrot, and leek, respectively, in the gastric phase. In the gastrointestinal phase, Cd bioaccessibility increased from 8 to 14 %, from 0.2 to 14 %, and from 1 to 8 % for French bean, carrot, and leek, respectively. These results suggest that this cooking destroyed vegetable tissues thoroughly and released Cd. Cooking and processing softened the plant tissues through swelling of the cell wall, dissolution/depolymerization of pectin, and cell separation (Hornero-Méndez and Mínguez-Mosquera 2007). The digestive process based on synthetic saliva, gastric fluids, and intestinal fluids caused crushing and shearing of the tissues and cells. Both mechanisms contributed to the high percentages of Cd bioaccessibility and their increase after the steaming process.

Potato

The average Cd bioaccessibility in cooked potatoes was 88.5 and 65.5 % for the steaming and frying



Fig. 2 Cd bioaccessibility in the gastric and gastrointestinal phases (mean and SD expressed as a % of total Cd concentration) in raw and steamed vegetables (French bean, n = 25; carrot, n = 28; and leek, n = 17)

processes, respectively, in the gastric phase and 74.9 and 42 %, respectively, in the gastrointestinal phase (Fig. 3).

Compared to the data on raw potatoes, few or no significant differences of Cd bioaccessibility were observed after the steaming process, while the frying process highly decreased bioaccessibility in both phases. More specifically, the variations recorded between raw and steamed potatoes were <5% in both phases. After the frying process, Cd bioaccessibility is decreased by 4–51% in the gastric phase and by 3–53% in the gastrointestinal phase. Unlike the results on French bean, carrot, and leek, the steaming



Fig. 3 Cd bioaccessibility in the gastric and gastrointestinal phases (mean and SD expressed as a % of total Cd concentration) in raw, steamed, and fried potatoes (n = 10)

process had no or a slight effect on the Cd bioaccessibility of potato. This suggests the possible presence of different biological structures and/or ligands in potato that might impede solubilization of Cd during digestion. The significant decrease in Cd bioaccessibility after the frying process could be explained by the change in the metal's chemical form, in particular Cd incorporation into the oil layer (due to the lipophilic nature of the oil), rendering Cd complexes less available for solubilization during digestion (Hornero-Méndez and Mínguez-Mosquera 2007).

Total concentrations versus bioaccessible concentrations from vegetables

Above, we provided evidence that a considerable amount of Cd, but not all, was mobilized from the seven vegetables during the digestion process (between 81 and 89 % in the gastric phase and between 63 and 72 % in the gastrointestinal phase). Compared to total Cd concentrations, consideration of the bioaccessibility from food led to a significant decrease in the metal exposure for the consumer (Fig. 4a). The total concentrations of Cd obtained for the seven vegetables were compared with the legal values given in the European Directive of 19 December 2006.

With regard to the legislation, vegetables have to contain Cd concentration levels below the legislation limits to be acceptable for human consumption. To evaluate the relevance of taking into account



775

Fig. 4 a Total and bioaccessible (in the gastric and gastrointestinal phases) concentrations of Cd in raw vegetables (data reported as fresh weight) with regard to legal values (European

Directive of 19 December 2006 for human consumption). **b** Proportion of homegrown vegetables in noncompliance with the legislation limits

bioaccessible concentrations instead of total concentrations from food, all data were compared with the legislation limits and the percentages of noncompliant samples were calculated with regard to total and bioaccessible concentrations (in both phases) (Fig. 4a, b). Taking into account the total concentrations, a significant proportion of the vegetables produced in the 34 kitchen gardens did not comply with the legislation: potato (90 %), leek (71 %), carrot (68 %), lettuce (63 %), and radish (48 %). For tomato, nonconformity was not systematic (25 %), and all French beans studied were in compliance with the legislation. Introduction of the bioaccessibility of vegetables into the calculations showed a noticeable decrease in percentages of noncompliant samples: potato (67 and 57 % in the gastric and gastrointestinal phases, respectively), leek (59 and 47 %, respectively), carrot (57 and 39 %, respectively), lettuce (56 and 44 %, respectively), and radish (36 and 28 %, respectively). For tomato and French bean, all samples were in compliance with the legislation with regard to bioaccessibility.

Conclusions

The present work evaluated the bioaccessibility of Cd in raw and cooked vegetables grown in smelterimpacted soils. This study was carried out on 34 kitchen gardens that were highly affected by the past smelter dust emissions. Since the closure and the industrial site renovation, emissions have entirely ceased. However, the high contamination level of Cd in the soils studied (from 4 to 20 mg kg⁻¹) continues to indicate a risk for the environment and the health of the local population, in particular through consumption of homegrown vegetables.

Several conclusions can be made:

- There was a positive relationship between the Cd concentrations measured in radish, potato, carrot, leek, and tomato and the degree of soil contamination; however, no significant differences were found in lettuce and French bean.
- The same behavior was observed for bioaccessible Cd concentrations in vegetables with regard to the contamination levels of soils.
- In this context, the bioaccessibility of Cd is totally concentration dependent in vegetables.
- A considerable amount of Cd was mobilized from raw vegetables during the gastric digestion process (on average 85 %). Bioaccessibility decreased in the gastrointestinal phase, but the Cd values remained high (on average 69 %).
- Cooking by steaming generally increased the bioaccessibility of Cd in French bean, carrot, and leek.
- For potato, few or no significant differences of Cd bioaccessibility were observed after the steaming process, while the frying process highly decreased the bioaccessibility in both phases.

The use of the in vitro digestion model to study bioaccessibility of Cd in vegetables provides relevant

information. However, this method should be validated for vegetables because it has been successfully benchmarked against an available in vivo experiment (Denys et al. 2012) to assess the bioaccessibility of Cd in soils. This would help promote the use of bioaccessibility as a conservative tool for evaluating oral bioavailability in risk assessment.

In the present study, the bioaccessibility of Cd from homegrown vegetables was high. However, by simulating the amount of Cd mobilized in the digestive juices, bioaccessibility analyses provide a more realistic estimate of exposure than do total metal concentrations from these vegetables. In a further investigation, more contaminants and more homegrown products should be tested.

Acknowledgments The authors wish to thank the gardeners who participated in the investigations. The study was funded by a grant from ADEME (French Agency for the Environment and energy Management) and the Nord—Pas de Calais Council.

References

- Alexander, P. D., Alloway, B. J., & Dourado, A. M. (2006). Genotypic variations in the accumulation of Cd, Cu, Pb and Zn exhibited by six commonly grown vegetables. *Environmental Pollution*, 144, 736–745.
- Alloway, B. J. (2004). Contamination of soils in domestic gardens and allotments; a brief overview. *Land Contamination* and Reclamation, 12, 179–187.
- Amiard, J. C., Amiard-Triquet, C., Charbonnier, L., Mesnil, A., Rainbow, P. S., & Wang, W. X. (2008). Bioaccessibility of essential and non-essential metals in commercial shellfish from western Europe and Asia. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2010–2022.
- Asagba, S. O. (2009). Role of diet in absorption and toxicity of oral cadmium—A review of literature. *African Journal of Biotechnology*, 8, 7428–7436.
- 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.
- Bešter, P. K., Lobnik, F., Eržen, I., Kastelec, D., & Zupan, M. (2013). Prediction of cadmium concentration in selected home-produced vegetables. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 96, 182–190.
- Broadway, A., Cave, M. R., Wragg, J., Fordyce, F. M., Bewley, R. J. F., Graham, M. C., et al. (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.
- Cabanero, A. I., Madrid, Y., & Camara, C. (2004). Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: An in vitro digestion method. *Analytica Chimica Acta*, 526, 51–61.

- Cambra, K., Martinez, T., Uzurlai, A., & Alonso, E. (1999). Risk analysis of a farm area near lead- and cadmiumcontaminated industrial site. *Journal of Soil Contamination*, 8, 527–540.
- Cox, S. F., Chelliah, M. C. M., McKinley, J. M., Palmer, S., Ofterdinger, U., Young, M. E., et al. (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.
- Denys, S., Caboche, J., Tack, K., Rychen, G., Wragg, J., Cave, M., et al. (2012). In vivo validation of the unified BARGE method to assess the bioaccessibility of arsenic, antimony, cadmium, and lead in soils. *Environmental Science and Technology*, 46, 6252–6260.
- 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.
- Douay, F., Pelfrêne, A., Planque, J., Fourrier, H., Richard, A., Roussel, H., & Girondelot, B. (2013). Assessment of potential health risk for inhabitants living near a former lead smelter. Part 1: Metal concentrations in soils, agricultural crops, and homegrown vegetables. *Environmental Monitoring and Assessment, 185*, 3665–3680.
- Etcheverry, P., Grusak, M. E., & Fleige, L. E. (2012). Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B6, B12, D, and E. *Frontiers in Physiology*, *3*, 317.
- Fu, J., & Cui, Y. (2013). In vitro digestion/Caco-2 cell model to estimate cadmium and lead bioaccessibility/bioavailability in two vegetables: The influence of cooking and additives. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 215–221.
- García-Sartal, C., Romarís-Hortas, V., Barciela-Alonso, M. D. C., Moreda-Piñeiro, A., Dominguez-Gonzalez, R., & Bermejo-Barrera, P. (2011). Use of an in vitro digestion method to evaluate the bioaccessibility of arsenic in edible seaweed by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 98, 91–96.
- Hall, J. L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1–11.
- He, M., Ke, C. H., & Wang, W. X. (2010). Effects of cooking and subcellular distribution on the bioaccessibility of trace elements in two marine fish species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3517–3523.
- Hemery, Y. M., Anson, N. M., Hevenaar, R., Haenen, G. R. M. M., Noort, M. W. J., & Rouau, X. (2010). Dry-fractionation of wheat bran increases the bioaccessibility of phenolic acids in breads made from processed bran fractions. *Food Research International*, 43, 1429–1438.
- Hornero-Méndez, D., & Mínguez-Mosquera, M. I. (2007). Bioaccessibility of carotenes from carrots: Effect of cooking and addition of oil. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 407–412.
- Houlbrèque, F., Hervé-Fernández, P., Teyssié, J. L., Oberhaënsli, F., Boisson, F., & Jeffree, R. (2011). Cooking makes cadmium contained in Chilean mussels less bioaccessible to humans. *Food Chemistry*, *126*, 917–921.

- Hu, J., Wu, F., Wu, S., Cao, Z., Lin, X., & Wong, M. H. (2013). Bioaccessibility, dietary exposure and human risk assessment of heavy metals from market vegetables in Hong Kong revealed with an in vitro gastrointestinal model. *Chemosphere*, 91, 455–461.
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125, 1–12.
- Intawongse, M., & Dean, J. R. (2008). Use of the physiologically-based extraction test to assess the oral bioaccessibility of metals in vegetable plants grown in contaminated soil. *Environmental Pollution*, 152, 60–72.
- Iqbal Lone, M., He, Z. L., Stoffella, P. J., & Yang, X. E. (2008). Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: Progresses and perspectives. *Journal of Zhejiang University Science B*, 9, 210–220.
- Jarup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. British Medical Bulletin, 68, 167–182.
- Jeffery, J., Holzenburg, A., & King, S. (2012). Physical barriers to carotenoid bioaccessibility. Ultrastructure survey of chromoplast and cell wall morphology in nine carotenoidcontaining fruits and vegetables. *Journal of the Science* and Food and Agriculture, 92, 2594–2602.
- Jiwan, M. A., Duane, P., O'Sullivan, L., O'Brien, N. M., & Aherne, S. A. (2010). Content and bioaccessibility of carotenoids from organic and non-organic baby foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 346–352.
- Knockaert, G., Lemmens, L., Van Buggenhout, S., Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2012). Changes in β-carotene bioaccessibility and concentration during processing of carrot puree. *Food Chemistry*, 133, 60–67.
- Koch, I., Dee, J., House, K., Sui, J., Zhang, J., McKnight-Whitford, A., & Reimer, K. J. (2013). Bioaccessibility and speciation of arsenic in country foods from contaminated sites in Canada. *Science of the Total Environment*, 449, 1–8.
- Kruger, J., Taylor, J. R. N., Du, X., De Moura, F. F., Lönnerdal, B., & Oelofse, A. (2013). Effect of phytate reduction of sorghum, through genetic modification, on iron and zinc availability as assessed by an in vitro dialysability bioaccessibility assay, Caco-2-cell uptake assay, and suckling rat pup absorption model. *Food Chemistry*, 141, 1019–1025.
- Maulvault, A. L., Machado, R., Afonso, C., Lourenço, H. M., Nunes, M. L., Coehlo, I., et al. (2011). Bioaccessibility of Hg, Cd and As in cooked black scabbard fish and edible crab. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 2808–2815.
- Millis, P. R., Ramsey, M. H., & John, E. A. (2004). Heterogeneity of cadmium concentration in soil as a source of uncertainty in plant uptake and its implications for human health risk assessment. *Science of the Total Environment*, 326, 49–53.
- Moreda-Pineiro, J., Moreda-Pineiro, A., Romaris-Hortas, V., Moscoso-Peres, C., Lopez-Mahia, P., Muniategui-Lorenzo, S., et al. (2011). In vivo and in vitro testing to assess the bioaccessibility and the bioavailability of arsenic, selenium and mercury species in food samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 30, 324–345.
- Mounicou, S., Szpunar, J., Andrey, D., Blake, C., & Lobinski, R. (2002). Development of a sequential enzymolysis approach for the evaluation of the bioaccessibility of Cd and Pb from cocoa. *Analyst*, 127, 1638–1641.

- Okorie, A., Entwistle, J., & Dean, J. R. (2011). The application of in vitro gastrointestinal extraction to assess oral bioaccessibility of potentially toxic elements from an urban recreational site. *Applied Geochemistry*, 26, 789–796.
- Oliver, M. A. (1997). Soil and human health: A review. European Journal of Soil Science, 48, 573–592.
- Oomen, A. G., Brandon, E. F. A., Swartjes, F. A., & Sips, A. J. A. M. (2006). How can information on oral bioavailability improve human health risk assessment for leadcontaminated soils? Report 711701042/2006, RIVM.
- Oomen, A. G., Hack, A., Minekus, M., Zeijdner, E., Schoeters, G., Verstraete, W., et al. (2002). Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. *Environmental Science and Technology*, 36, 3326–3334.
- Oomen, A. G., Rompelberg, C. J., Bruil, M. A., Dobbe, C. J., Pereboom, D. P., & Sips, A. J. (2003). Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. Archive of Environmental Contamination and Toxicology, 44, 281–287.
- Ouédraogo, O., & Amyot, M. (2011). Effects of various cooking methods and food components on bioaccessibility of mercury from fish. *Environmental Research*, 111, 1064–1069.
- Palmero, P., Lemmens, L., Ribas-Agusti, A., Sosa, C., Met, K., Umunoti, J. D. D., et al. (2013). Novel targeted approach to better understand how natural structural barriers govern carotenoids in vitro bioaccessibility in vegetable-based systems. *Food Chemistry*, 141, 2036–2043.
- Pelfrêne, A., Douay, F., Richard, A., Roussel, H., & Girondelot, B. (2013a). Assessment of potential health risk for inhabitants living near a former lead smelter. Part 2: Sitespecific human health risk assessment of Cd and Pb contamination in kitchen gardens. *Environmental Monitoring* and Assessment, 185, 2999–3012.
- Pelfrêne, A., Waterlot, C., & Douay, F. (2011a). In vitro digestion and DGT techniques for estimating cadmium and lead bioavailability in contaminated soils: Influence of gastric juice pH. *Science of the Total Environment*, 409, 5076–5085.
- Pelfrêne, A., Waterlot, C., & Douay, F. (2013b). Influence of land use on human bioaccessibility of metals in smelterimpacted soils. *Environmental Pollution*, 178, 80–88.
- Pelfrêne, A., Waterlot, C., Mazzuca, M., Nisse, C., Bidar, G., & Douay, F. (2011b). Assessing Cd, Pb, Zn human bioaccessibility in smelter-contaminated agricultural topsoils (norther France). *Environmental Geochemistry and Health*, 33, 477–493.
- Pelfrêne, A., Waterlot, C., Mazzuca, M., Nisse, C., Cuny, D., Richard, A., et al. (2012). Bioaccessibility of trace elements as affected by soil parameters in smelter-contaminated agricultural soils: A statistical modeling approach. *Environmental Pollution*, 160, 130–138.
- Reilly, C. (1991). Metal contamination of food (2nd ed.). London: Elsevier Applied Science.
- 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.
- Signes-Pastor, A. J., Al-Rmalli, S. W., Jenkins, R. O., Carbonell-Barrachina, A. A., & Haris, P. I. (2012). Arsenic

bioaccessibility in cooked rice as affected by arsenic in cooking water. *Journal of Food Science*, 77, 201–206.

- Sterckeman, T., Douay, F., Proix, N., & Fourrier, H. (2000). Vertical distribution of Cd, Pb and Zn in soils near smelters in the North of France. *Environmental Pollution*, 107, 377–389.
- Sterckeman, T., Douay, F., Proix, N., Fourrier, H., & Perdrix, E. (2002). Assessment of the contamination of cultivated soils by eighteen trace elements around smelters in the North of France. *Water, Air, and Soil Pollution, 135*, 173–194.
- Sun, G. X., Van de Wiele, T., Alava, P., Tack, F., & Laing, G. D. (2012). Arsenic in cooked rice: Effect of chemical, enzymatic and microbial processes on bioaccessibility and speciation in the human gastrointestinal tract. *Environmental Pollution*, 162, 241–246.
- Swartjes, F. A., Versluijs, K. W., & Otte, P. F. (2013). A tiered approach for the human health risk assessment for consumption of vegetables from with cadmium-contaminated land in urban areas. *Environmental Research*, 126, 223–231.
- Tokalioğlu, S., Clough, R., Foulkes, M., & Worsfold, P. (2014). Bioaccessibility of Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se and Zn from nutritional supplements by the unified BARGE method. *Food Chemistry*, 150, 321–327.

- Uzu, G., Sobanska, S., Sarret, G., Munoz, M., & Dumat, C. (2010). Foliar lead uptake by lettuce exposed to atmospheric fallouts. *Environmental Science and Technology*, 44, 1036–1042.
- Voutsa, D., Grimanis, A., & Samara, C. (1996). Trace elements in vegetables grown in an industrial area in relation to soil and air particulate matter. *Environmental Pollution*, 94, 325–335.
- Waisberg, M., Black, W. D., Waisberg, C. M., & Hale, B. (2004). The effect of pH, time and dietary source of cadmium on the bioaccessibility and adsorption of cadmium to/from lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. Ostinata). *Food and Chemical Toxicology*, 42, 835–842.
- Wang, H. S., Zhao, Y. G., Man, Y. B., Wong, C. K. C., & Wong, M. H. (2011). Oral bioaccessibility and human risk assessment of organochlorine pesticides (OCPs) via fish consumption, using an in vitro digestion model. *Food Chemistry*, 127, 1673–1679.
- Wragg, J., Cave, M. R., Basta, N., Brandon, E., Casteel, S. E. B., Denys, S., et al. (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.

II.3.2.2. Cas du plomb

La bioaccessibilité orale de Pb a été déterminée dans les deux phases d'extraction pour l'ensemble des légumes crus (n = 208) (Figure II.7) [51]. Dans de nombreux cas, les concentrations mesurées sont assez faibles et près d'un échantillon sur deux présente des concentrations inférieures aux limites de quantification de l'appareil (ICPMS). Les concentrations bioaccessibles en Pb les plus élevées sont mesurées dans les légumes présentant les concentrations totales les plus élevées, à savoir le radis, la laitue, la carotte et le poireau. En moyenne, les concentrations bioaccessibles sont légèrement plus importantes dans la phase G que dans la phase GI. Les valeurs obtenues pour le haricot vert et la pomme de terre sont faibles et non détectables dans la phase GI pour la pomme de terre.



Figure II.7. Concentrations bioaccessibles en Pb (moyennes et écarts types) mesurées dans les phases G et GI dans les légumes crus. pdt = pomme de terre ; haricot = haricot vert [51]

La Figure II.8 présente les concentrations bioaccessibles pour Pb exprimées en pourcentage des concentrations totales mesurées dans les légumes crus.



Figure II.8. Bioaccessibilité de Pb (moyennes et écarts types ; en % des concentrations totales) mesurées dans les phases G et GI dans les légumes crus. pdt = pomme de terre ; haricot = haricot vert [51]

Les résultats varient selon le légume considéré : (1) la fraction bioaccessible dans les deux phases est plus importante pour le haricot vert (82% dans la phase G et 60% dans la phase GI), la carotte (75% et

63%) et le poireau (69% et 60%) que pour le radis (54% et 43%) et la laitue (58% et 50%); (2) pour la tomate et la pomme de terre, la part bioaccessible est forte dans la phase G (69% et 79% respectivement), tandis qu'elle est très faible voire non détectable dans la phase GI.

Un des facteurs affectant potentiellement la bioaccessibilité orale est le degré de contamination en métal dans la matrice considérée. Une relation proportionnelle entre la bioaccessibilité et la concentration de métal dans le légume a été observée pour Cd [6] et Pb (Figure II.9). En effet, la bioaccessibilité de Pb dans les phases G et GI augmente significativement lorsque la concentration mesurée dans les légumes augmente et ce, quel que soit le légume considéré (avec R^2 de 0,93 dans la phase G et de 0,69 dans la phase GI), ce qui indique que, dans ces conditions, la bioaccessibilité est dépendante de la concentration.



Figure II.9. Corrélations entre les concentrations bioaccessibles de Pb (dans les phases G et GI) et celles mesurées dans tous les légumes étudiés (n = 136)

L'influence de la cuisson vapeur sur la bioaccessibilité de Pb a été étudiée pour le haricot vert, la carotte et le poireau (Figure II.10). En moyenne, les résultats mettent en évidence (1) une diminution de la bioaccessibilité de Pb dans la phase G et ce, principalement pour le haricot vert et le poireau et (2) une augmentation de Pb dans la phase GI pour les trois légumes considérés.



Figure II.10. Comparaison de la bioaccessibilité orale de Pb (exprimée en % des concentrations totales) dans les phases G et GI mesurée dans les légumes crus et celle mesurée dans les légumes cuits à la vapeur [51]

II.3.2.3. Cas du zinc

Comme pour Cd et Pb, la bioaccessibilité orale de Zn a été déterminée dans les deux phases d'extraction pour l'ensemble des légumes crus (n = 208) (Figure II.11) [51]. Les concentrations bioaccessibles en Zn les plus élevées sont mesurées dans les légumes présentant les concentrations totales les plus élevées, à savoir le radis, la laitue et le poireau. Les valeurs les plus faibles sont mesurées dans la tomate et la pomme de terre. En moyenne, les concentrations bioaccessibles sont très légèrement plus importantes dans la phase G que dans la phase GI.



Figure II.11. Concentrations bioaccessibles en Zn (moyennes et écarts types) mesurées dans les phases G et GI dans les légumes crus. pdt = pomme de terre ; haricot = haricot vert [51]

La Figure II.12 présente les concentrations bioaccessibles pour Zn exprimées en pourcentage des concentrations totales mesurées dans les légumes crus.



Figure II.12. Bioaccessibilité de Zn (moyennes et écarts types ; en % des concentrations totales) mesurées dans les phases G et GI dans les légumes crus. pdt = pomme de terre ; haricot = haricot vert [51]

Les résultats mettent en évidence une forte bioaccessibilité de Zn dans les deux phases et ce, pour les sept légumes étudiés (en moyenne 87% dans la phase G et 79% dans la phase GI). Une relation proportionnelle entre la bioaccessibilité et la concentration de métal dans le légume est également observée pour Zn (Figure II.13). En effet, la bioaccessibilité de Zn dans les phases G et GI

augmente significativement lorsque la concentration mesurée dans les légumes augmente et ce, quel que soit le légume considéré (avec R^2 de 0,98 dans la phase G et de 0,97 dans la phase GI), ce qui indique que, dans ces conditions, la bioaccessibilité est dépendante de la concentration.



Figure II.13. Corrélations entre les concentrations bioaccessibles de Zn (dans les phases G et GI) et celles mesurées dans tous les légumes étudiés (n = 179)

L'influence du mode de cuisson sur la bioaccessibilité de Zn a été étudiée : (1) cuisson à la vapeur pour le haricot vert, la carotte et le poireau (Figure II.14) et (2) cuisson à la vapeur et en friture pour la pomme de terre (Figure II.15).





Après cuisson à la vapeur, les résultats mettent en évidence une augmentation de la bioaccessibilité de Zn dans les deux phases et ce, pour les trois légumes étudiés (haricot vert, carotte et poireau). Pour la pomme de terre, la cuisson à la vapeur entraîne une légère augmentation de la bioaccessibilité orale de Zn dans la phase G et une diminution de ce paramètre dans la phase GI. Après cuisson en friture, les concentrations bioaccessibles de Zn diminuent dans les deux phases.



Figure II.15. Comparaison de la bioaccessibilité de Zn (exprimée en % des concentrations totales) dans les phases G et GI mesurée dans les pommes de terre crues, cuites à la vapeur et en friture [51]

II.3.2.4. Discussion

La bioaccessibilité des métaux dans les végétaux est contrôlée par plusieurs facteurs tels que les fibres, les phytochélatines, les caractéristiques nutritionnelles, les processus microbiens et la spéciation de l'élément considéré (Mounicou et al., 2002 ; Maulvault et al., 2011 ; Sun et al., 2012). De plus, les caractéristiques du végétal, la concentration et le type d'enzymes utilisés dans le test *in vitro* sont des facteurs clés qui contrôlent la digestion. Suivant le test utilisé, des concentrations importantes en enzymes accélèrent la digestion ou la dégradation des composés du végétal (Hur et al., 2011). Le test UBM utilisent des solutions digestives synthétiques dont la composition est très proche de la physiologie de l'Homme (Oomen et al., 2003a, 2006).

Dans cette étude, j'ai mis en évidence une influence du mode de cuisson sur la bioaccessibilité de Cd, Pb et Zn pour le haricot vert, la carotte, le poireau et la pomme de terre. Il a été montré dans la littérature que le mode de cuisson peut altérer la bioaccessibilité orale des éléments (Koplik et al., 2004 ; Hornero-Mendez et Minguez-Mosquera, 2007 ; Fu et Cui, 2013). En effet, les caractéristiques des légumes ainsi que la composition des solutions digestives sont des facteurs clés qui contrôlent la digestion des composés durant le test in vitro. Dans les légumes, les métaux sont accumulés dans la paroi cellulaire, la vacuole et le cytoplasme. Les polysaccharides et les protéines présents dans la paroi cellulaire contiennent des groupes oxhydryles, carboxyles, aldéhydes et phosphates qui ont des affinités pour les ions métalliques. Ainsi, la destruction des parois cellulaires et des compartiments subcellulaires entraîne un relargage des métaux dans les solutions gastriques et intestinales. Parmi les composés des solutions digestives, les enzymes jouent un rôle important sur l'intégrité de la paroi cellulaire. Suivant leurs concentrations et leurs compositions, la digestion ou dégradation des composés des légumes est plus ou moins accélérée. Par exemple, la pepsine casse les protéines et les peptides en plus petits peptides et acides aminés, tandis que l'amylase joue un rôle dans la conversion de l'amidon en oligosaccharides et monosaccharides. L'augmentation de la bioaccessibilité orale des métaux dans les légumes cuits à la vapeur pourrait s'expliquer par la destruction des tissus lors de la cuisson et la solubilisation des métaux dans les solutions digestives. Par contre, la diminution de la bioaccessibilité pourrait s'expliquer par un changement de spéciation des métaux au sein du légume. Concernant la bioaccessibilité des métaux après cuisson en friture, la forte diminution observée peut également être expliquée par le processus d'absorption des métaux induisant ainsi un changement de spéciation dans le tractus gastro-intestinal.

Bilan : L'utilisation d'un test in vitro de digestion pour étudier la bioaccessibilité orale des métaux dans les légumes fournit une information pertinente. Dans le contexte du site atelier, les bioaccessibilités mesurées de Cd, Pb et Zn sont relativement importantes et donnent une estimation plus réaliste que les concentrations totales mesurées dans les légumes.

II.4. Bioaccessibilité des métaux dans les poussières

II.4.1. Diagnostic de la contamination des poussières sédimentées extérieures sur le secteur d'étude

Bien qu'omniprésentes dans l'environnement, les poussières présentent des spécificités qui résultent de la diversité de leur origine, de leur nature, de leur granulométrie, de leur degré de contamination mais aussi, de leur variabilité spatiale et temporelle. La granulométrie des poussières conduit à différentier les particules en suspension dans l'air et les poussières sédimentées. Il convient également de différentier les poussières extérieures et intérieures aux habitations. Les premières, sont constituées majoritairement de particules de terre, d'écailles de peinture liées à l'altération des murs et revêtements, d'éléments liés à l'automobile, à la corrosion des pièces métalliques et de matériels apportés par le vent. Les poussières intérieures ont une composition et des teneurs en métaux qui différent fortement selon les activités associées à la pièce, la ventilation des habitations ou la saison. Elles incluent des particules de terre, des poussières de routes et trottoirs, du matériel particulaire apporté par le vent, des écailles de peintures extérieures et intérieures, des résidus issus de la cuisson et la combustion mais aussi, des particules liées aux activités professionnelles voire de loisirs. Le nettoyage et l'époussetage régulier des sols et des meubles tendent à réduire sensiblement la contamination intérieure des habitations. Malgré des natures et des compositions différentes, il existe une continuité entre les poussières extérieures et intérieures des habitations, les premières contribuant à alimenter les secondes au profit des portes et fenêtres (Calabrese et Stanek, 1992; Trowbridge et Burmaster, 1997; Clark et al., 2004; Caravanos et al., 2006). Les poussières ont fait l'objet de plusieurs études ayant pour objectif de mettre en relation les concentrations en métaux dans les poussières avec celles mesurées dans les sols. En particulier, ont été étudiées les relations pouvant exister entre les concentrations en métaux des poussières intérieures et celles des poussières extérieures ou des sols de jardin (Davies et al., 1985 ; Gulson et al., 1995 ; Rasmussen et al., 2001). Au regard des poussières extérieures, les recherches sur les poussières intérieures sont plus nombreuses. Leur caractérisation vise le plus souvent à mettre en évidence leur relation avec la plombémie des jeunes enfants. Ainsi, de nombreux travaux ont montré des corrélations positives entre les concentrations en plomb dans le sang chez les enfants et celles dans les poussières intérieures de leurs lieux de vie (Charney et al., 1980; Bornschain et al., 1985; Duggan et Inskip, 1985; Rabinowitz et al., 1985 ; Laxen et al., 1987 ; Davies et al., 1990). Des études similaires ont été menées sur le secteur d'étude, principalement aux alentours de l'ancienne fonderie Metaleurop Nord. En effet, les diagnostics environnementaux réalisés par les services en charge de la santé depuis 1994, en lien avec les différentes campagnes de dépistage du saturnisme infantile, ont montré une forte contamination en Pb des poussières présentes sur les lieux de vie des jeunes enfants (domiciles, écoles, aires de jeux...).

Dans la continuité de cette démarche, une étude a été menée par le LGCgE-ISA Lille en 2007 visant à caractériser les poussières sédimentées extérieures aux alentours de Metaleurop Nord et de Nyrstar (Vanrullen et al., 2007). L'objectif général était de rechercher l'existence de relations entre le degré de contamination en Pb des sols, celui des poussières et la plombémie des jeunes enfants. Deux techniques d'échantillonnages ont été mises en place :

(1) la méthode par lingettes humides (norme française relative à l'arrêté du 12 juillet 1999) : la collecte des poussières a été réalisée sur une surface de 0,3 m² au moyen de lingettes de type humidifié (Prodène Aseptil). Les lingettes ont ensuite été conditionnées dans un flacon avant d'être mises en contact avec 75 mL d'HCl (0,15 M). Après un contact de 24 h, les métaux de la solution sont dosés. Ce protocole vise à mesurer la fraction acido-soluble des métaux dans les poussières et permet d'avoir une information sur les quantités de métaux pour une surface donnée.

(2) la méthode par balayage : le protocole est assez délicat car nécessite la maîtrise de différents paramètres tels que la surface échantillonnée, le temps de balayage et le réenvol de particules. Dans cette étude, l'échantillonnage a été réalisé dans un cadre de 0,5 sur 1,20 m au moyen d'une balayette. Après séchage, pesée et tamisage, les échantillons ont été minéralisés à l'eau régale en vue de déterminer les concentrations pseudototales. Cette technique permet de fournir des données sur la granulométrie des poussières ainsi que les quantités surfaciques et massiques.

Le Tableau II.4 renseigne sur la distribution des concentrations en Cd et Pb des poussières collectées lors de cette étude par la méthode des lingettes humides et par balayage. Pour le dernier mode d'échantillonnage, seules les concentrations en métaux dans la fraction la plus fine (< 53 µm) sont présentées. Les résultats de cette étude ont mis en évidence l'existence d'une corrélation étroite entre les concentrations en Pb et Cd des lingettes avec celles des sols. L'analyse granulométrique des poussières collectées par balayage a révélé une dominance des échantillons dont les particules fines sont majoritaires. Les particules les plus fines sont également celles qui sont les plus chargées en métaux et donc potentiellement plus dangereuses pour la santé.

Tableau II.4. Distribution des concentrations en Cd et Pb dans les échantillons de poussières sédimentées
collectés sur le secteur d'étude en 2007 au moyen de différentes techniques (Vanrullen et al., 2007)

	Lingettes humides $(n = 161)$		Balayage $(n = 53)$		
	Cd	Dh	fraction	< 53 μm Db	
	μg/m ²		mg/kg		
min	0,6	16	-	-	
moyenne	6,7	440	8,3	702	
médiane	3,9	256	3,9	250	
max	80,0	12330	-	-	
écart type	-	-	17,4	2176	

En 2012, une nouvelle campagne de dépistage du saturnisme infantile a été réalisée par l'InVS sur les trois communes aux alentours de l'ancienne fonderie. Dans ce contexte, j'ai entrepris une nouvelle étude [52] visant à contribuer à l'évaluation des risques sanitaires en lien avec l'ingestion et l'inhalation de poussières extérieures contaminées par Pb et Cd et ce, dix ans après la fermeture de l'ancienne fonderie. La démarche a porté sur les poussières sédimentées sur les trottoirs attenants aux habitations des enfants dépistés lors de la campagne de 2012. Les échantillons de poussières ont été collectés par aspiration au moyen de l'appareil HVS3¹ développé pour l'USEPA² pour déterminer les concentrations en polluants (métalliques et/ou organiques) dans des poussières intérieures ou extérieures aux habitations. Cet aspirateur, de type cyclonique, est utilisé dans les évaluations environnementales et sanitaires, principalement pour la collecte de poussières intérieures aux habitations (e.g. Starr et al., 2008; Quiros-Alcala et al., 2011; Deziel et al., 2014; Gunier et al., 2014). Cette technique, bien que non mise en œuvre jusqu'à présent lors des dépistages environnementaux en Région Nord - Pas de Calais, présente de multiples avantages. Comparé à d'autres techniques d'échantillonnage des poussières, l'HVS3 se veut plus précis et plus efficace en terme de collecte (Sterling et al., 1999). De plus, outre le fait d'exprimer une contamination massique et/ou surfacique des polluants, cette technique permet de disposer d'un matériel représentatif de ce compartiment en vue, par exemple, d'étudier la distribution des métaux dans les différentes fractions granulométriques et donc ainsi, de mieux évaluer l'exposition des populations. La Figure II.16 présente la répartition pondérale des poussières selon leur granulométrie. Les résultats montrent que les classes les plus représentées en poids sont les fractions 250-1000 µm et > 1 mm, chacune représentant en moyenne respectivement 35 et 29% du poids total des échantillons. Les fractions 5-50

¹ High Volume Small Surface Sampler

² United States Environmental Protection Agency

 μ m, 50-150 μ m et 150-250 μ m sont moins représentées et de proportions assez équivalentes (entre 8 et 15% en moyenne). La fraction la plus fine (0,3-5 μ m) est négligeable et représente en moyenne 0,06% du poids total des échantillons.



Figure II.16. Répartition pondérale des poussières selon leur granulométrie (moyennes ± écarts types) [50]

Les concentrations en Cd et Pb ont été déterminées dans les différentes fractions de poussières collectées, après élimination de la fraction > 1 mm (Figure II.17).



Figure II.17. Distribution des concentrations massiques (en mg/kg) et surfaciques (en $\mu g/m^2$) en Cd et Pb dans les différentes fractions granulométriques de poussières (moyennes \pm écarts types) [50]

Les résultats sur les concentrations massiques mettent en évidence des concentrations moyennes en Cd et Pb beaucoup plus élevées pour la fraction 0,3-5 μ m et qui, globalement, diminuent lorsque la taille des particules augmente. De plus, la grande amplitude des écarts types souligne la grande variabilité des résultats obtenus dans chaque fraction. Comme pour l'étude de 2007 (Vanrullen et al., 2007), ces données montrent toutefois une contamination plus forte des fractions de poussières les plus fines, ce qui pourrait accroître le risque d'exposition des populations. Ramenés à la surface échantillonnée et au

poids de chacune des fractions collectées, les résultats sur les concentrations surfaciques présentent une grande variabilité. Les concentrations moyennes les plus élevées sont mesurées dans les fractions 50-150 μ m et 250-1000 μ m, tandis que dans la fraction la plus fine (0,3-5 μ m), les concentrations sont très faibles (0,21 et 12,8 μ g/m² pour Cd et Pb, respectivement). Les concentrations surfaciques moyennes mesurées dans les fractions 5-50 μ m et 150-250 μ m sont comparables.

Quelles que soient les techniques d'échantillonnage et d'analyses utilisées, les résultats sur les poussières montrent qu'il existe toujours, 4 ans et 10 ans après la fermeture de Metaleurop Nord, une relation forte avec cette ancienne source d'émission, mettant en évidence un lien étroit entre la contamination du milieu et celui des poussières extérieures sédimentées. Ainsi, ces dernières sont une composante environnementale à intégrer dans l'évaluation de l'exposition des populations, et notamment des jeunes enfants.

Parmi les voies d'exposition dans l'imprégnation par les métaux des populations, l'ingestion *via* les poussières est la voie prioritaire, en particulier pour les enfants de moins de six ans (Kimbrough et al., 1995). En outre, le risque sanitaire dû aux poussières est lié à la taille des particules. Plus elles sont fines et plus elles se remettent facilement en suspension. Ce sont aussi celles qui ont une capacité de fixation accrue des métaux au regard des particules les plus grossières et sont donc les plus problématiques pour la santé humaine. Aussi, les fines particules peuvent pénétrer profondément dans l'appareil respiratoire (Wragg et Klinck, 2007 ; Broadway et al., 2010).

L'évaluation des risques, quelle que soit la voie d'exposition des populations, est le plus souvent raisonnée au regard des concentrations totales en polluants. J'ai montré précédemment sur les matrices « sol » et « légumes » que la mesure de la fraction bioaccessible permettait de mieux estimer l'exposition aux métaux. Qu'en est-il de la matrice « poussières » ? Plus spécifiquement, mes travaux de recherche ont porté sur la caractérisation des poussières accessibles à la population, notamment aux enfants et plus particulièrement, sur la détermination de la bioaccessibilité orale et pulmonaire de Cd et Pb dans les différentes fractions granulométriques de poussières sédimentées collectées au moyen d'un aspirateur [50].

II.4.2. Bioaccessibilité orale et pulmonaire des métaux dans les poussières sédimentées extérieures

II.4.2.1. Méthodologie

Les investigations que j'ai réalisées sur le site atelier **[50]** ont consisté à collecter les poussières sédimentées extérieures (sur des trottoirs en macadam) par aspiration au moyen de l'appareil HVS3. Son principe réside dans l'aspiration à fort débit des poussières déposée sur le sol. Dans le cyclone, les poussières aspirées sont séparées. Les plus grosses particules (> 5 µm) sont collectées dans un flacon destiné à l'analyse des composés présents. Les plus petites particules (< 5 µm) suivent le courant d'air et sont collectées sur un filtre en fibre de verre d'une porosité de 0,3 µm. Ainsi, pour un site d'échantillonnage donné, deux fractions de poussières sont collectées : (1) des particules dont la dimension est supérieure à 5 µm (dans le collecteur) et (2) des particules comprises entre 0,3 et 5 µm (sur le filtre). Des essais ont été réalisés au préalable en vue de calibrer l'appareil et définir la surface optimale d'échantillonnage. Au regard des quantités nécessaires pour les expérimentations, j'ai fixé la surface échantillonnée à 1 m².

Afin de mieux connaître la distribution et la bioaccessibilité des métaux selon la granulométrie, les poussières récupérées dans le collecteur ont été tamisées afin de distinguer 4 fractions : entre 1 mm et 250 μ m, entre 250 μ m et 150 μ m, entre 150 μ m et 50 μ m et 5 μ m. Au total, cinq fractions de poussières ont été collectées au moyen de l'HVS3 sur lesquelles ont été déterminées, dans un premier temps, les concentrations totales en métaux (minéralisation à l'eau régale) afin de disposer d'une information sur le degré de contamination en fonction de la granulométrie. Dans un second temps, j'ai déterminé la bioaccessibilité de Cd et Pb en lien avec l'ingestion et l'inhalation des poussières.

- Dans le cas de l'ingestion, les protocoles cités dans la littérature (dont le test UBM) sont classiquement réalisées sur une matrice passée au travers d'un tamis de 250 µm, ce qui correspond à la fraction qui adhère aux mains et qui est susceptible d'être ingérée par les enfants (Duggan et al., 1985). Certains auteurs ont montré que la prise en compte de fractions plus fines, notamment la fraction inférieure à 50 µm, était plus réaliste (Kissel et al., 1996). Pour préciser l'exposition des populations, et plus particulièrement des jeunes enfants, j'ai fait le choix d'évaluer la bioaccessibilité orale sur l'ensemble des fractions obtenues au moyen du test UBM.
- Dans le cas de **l'inhalation**, étant donné que seules les particules très fines atteignent les alvéoles pulmonaires, j'ai fait le choix de déterminer la bioaccessibilité pulmonaire de Cd et Pb uniquement sur la fraction 0,3-5 µm collectée sur le filtre et ce, au moyen du test ALF.

Pour l'étude de l'évaluation de l'exposition des populations en lien avec les deux voies d'exposition, 40 sites au total ont été considérés.

II.4.2.2. Exposition des populations en lien avec l'ingestion de poussières

Les Figures II.18, II.19 et II.20 présentent l'ensemble des résultats obtenus sur la bioaccessibilité orale de Cd et Pb dans chacune des fractions de poussières collectées (résultats exprimés en concentrations massiques, surfaciques et en pourcentages des concentrations totales).



Figure II.18. Concentrations bioaccessibles de Cd et Pb (moyennes \pm écarts types, exprimés en concentrations massiques, mg/kg) dans les phases G et GI pour chaque fractions granulométriques de poussières (n = 40) [50]

Les concentrations bioaccessibles moyennes de Cd et Pb (dans les deux phases), exprimées en concentrations massiques, sont plus élevées dans la fraction la plus fine (0,3-5 μ m) et diminuent lorsque la taille des particules augmente (Figure II.18). Exprimées en bilan surfacique (Figure II.19), les concentrations bioaccessibles moyennes sont plus élevées dans les fractions 50-150 μ m et 250-1000 μ m pour Cd et dans les fractions 5-50 μ m et 50-150 μ m pour Pb et sont très faibles dans la fraction la plus fine.



Figure II.19. Concentrations bioaccessibles de Cd et Pb (moyennes \pm écarts types, exprimés en concentrations surfaciques, $\mu g/m^2$) dans les phases G et GI pour chaque fractions granulométriques de poussières (n = 40) [50]

Exprimés en pourcentage des concentrations totales mesurées dans les poussières (Figure II.20), les résultats mettent en évidence une bioaccessibilité moyenne de Cd et Pb beaucoup plus élevée pour la fraction 0,3-5 μ m dans les deux phases d'extraction (81% et 30% pour Cd et 81% et 36% pour Pb respectivement dans les phases G et GI) et qui, globalement, diminue lorsque la taille des particules augmente (dans la fraction 250-1000 μ m : 23% et 12% pour Cd er 14% et 11% pour Pb respectivement dans les phases G et GI). Ces résultats s'expliquent par une capacité de fixation des métaux plus forte du fait de la finesse des particules (surfaces d'absorption plus élevées, nature des constituants...).



Figure II.20. Bioaccessibilité de Cd et Pb (moyennes \pm écarts types, exprimés en % des concentrations totales) dans les phases G et GI pour chaque fractions granulométriques de poussières (n = 40) [50]

Le fait que la bioaccessibilité des métaux soit plus importante dans la fraction la plus fine comparée aux autres fractions peut s'expliquer par la spéciation des métaux ainsi que par différents types de liaison entre les métaux et les particules. De plus, la bioaccessibilité des métaux est réduite de manière significative entre la phase G et la phase GI. Comme pour la matrice sol, cette diminution peut s'expliquer par des processus de complexation/réadsorption des métaux avec les constituants des poussières ou certains composés des solutions digestives, et/ou de précipitation des métaux, en lien avec l'augmentation du pH dans la phase GI (Ellickson et al., 2001 : Grøn et Andersen, 2003).

Comme énoncé précédemment, la majorité des protocoles *in vitro* de digestion prévoit de travailler sur un matériel < 250 μ m. Pour Kissel et al. (1996), la fraction < 50 μ m serait plus pertinente et plus réaliste de la fraction adhérente aux mains des enfants. Au regard de mes résultats, j'ai comparé les résultats de bioaccessibilité des métaux en considérant les fractions < 50 μ m et < 250 μ m (Figure II.21).



Figure II.21. Bioaccessibilité de Cd et Pb (moyennes \pm écarts types, exprimés en % des concentrations totales) dans les phases G et GI pour les fractions granulométriques de poussières < 50 µm et < 250 µm (n = 40) [50]

En moyenne, la bioaccessibilité de Cd et Pb dans les deux phases est plus importante en considérant la fraction plus fine (< 50 μ m) en comparaison de la fraction < 250 μ m classiquement utilisée. Ces résultats montrent que, dans le cadre d'une évaluation de risques, prendre en compte la fraction < 250 μ m minimise les risques et ceci, d'autant plus pour Pb qui présente dans la phase G une différence importante entre les deux fractions considérées (65% pour la fraction < 50 μ m et 40% pour la fraction < 250 μ m).

Bilan : L'utilisation d'un test in vitro de digestion pour étudier la bioaccessibilité orale des métaux dans les poussières fournit une information pertinente. Les valeurs moyennes dans la phase gastrointestinale (phase la plus pertinente d'un point de vue physiologique) sont inférieures à 40%, ce qui indique qu'une partie des métaux n'est pas disponible en cas d'ingestion de poussières. Ainsi, la bioaccessibilité orale peut être appliquée en tant que facteur correctif dans l'évaluation des risques au regard de la concentration totale en métaux, permettant ainsi une estimation moins conservatrice de l'imprégnation des populations.

II.4.2.3. Exposition des populations en lien avec l'inhalation de poussières

Suite aux différents essais que j'ai réalisés sur différentes solutions pulmonaires (*cf* § I.3.2), mon choix s'est porté sur l'utilisation du fluide ALF pour déterminer la bioaccessibilité de Cd et Pb dans la fraction fine de poussières (0,3-5 μ m). L'expérimentation a été réalisée sur les filtres de l'aspirateur et plus spécifiquement sur un quart de filtre. Pour permettre un bon contact entre les particules de poussières et la solution ALF, j'ai choisi un volume de 20 mL.

Pour les 40 échantillons étudiés, la bioaccessibilité pulmonaire de Cd et Pb, exprimée en concentration massique, varie respectivement de 3,0 à 79,5 mg/kg (15,6 mg/kg en moyenne) et de 143 à 6180 mg/kg (881 mg/kg en moyenne) (Figure II.22). Exprimée en bilan surfacique, la bioaccessibilité pulmonaire des métaux est très faible et varie de 0,001 à 0,23 μ g/m² (0,056 μ g/m² en moyenne) pour Cd et de 0,054 à 20,8 μ g/m² (3,17 μ g/m² en moyenne) pour Pb (Figure II.22).



Figure II.22. Distribution de la bioaccessibilité pulmonaire de Cd et Pb (moyennes \pm écarts types, exprimés en concentrations massiques, mg/kg, et en concentrations surfaciques, μ g/m²) dans les poussières collectées sur les filtres (0,3 – 5 μ m) (n = 40) [**50**]

La distribution des concentrations bioaccessibles (exprimées en % par rapport aux concentrations totales) de Cd et Pb est présentée Figure II.23. La solubilité des métaux dans le fluide pulmonaire ALF est relativement importante (74% pour Cd et 69% pour Pb en moyenne) et varie de 50 à 100% pour Cd et de 45 à 92% pour Pb.



Figure II.23. Distribution de la bioaccessibilité pulmonaire de Cd et Pb (en %) dans les poussières collectées sur les filtres $(0,3-5 \ \mu m) \ (n = 40)$ [**50**]

De très fortes corrélations sont observées entre les concentrations bioaccessibles dans le fluide pulmonaire et les concentrations totales en Cd et Pb ($R^2 = 0.97$ et 0.98 respectivement ; Figure II.24) mesurées dans les poussières, indiquant que la concentration totale des métaux étudiés est le paramètre majeur qui explique leur bioaccessibilité pulmonaire. De très bonnes corrélations avaient également été observées pour la matrice « légumes » (bioaccessibilité orale *versus* concentrations totales), tandis que pour la matrice « sol », j'ai montré que d'autres paramètres physico-chimiques ont une influence sur la bioaccessibilité orale des métaux, en plus de la concentration totale mesurée dans le sol.



Figure II.24. Relation entre les concentrations bioaccessibles dans les solutions pulmonaires et les concentrations totales pour Cd et Pb (en mg/kg) mesurées dans poussières collectées sur les filtres $(0,3-5 \ \mu m) \ (n = 40) \ [50]$

L'utilisation du test in vitro avec la solution ALF pour étudier la bioaccessibilité pulmonaire des métaux dans les poussières montre que les valeurs moyennes pour Cd et Pb sont relativement élevées (74% pour Cd et 69% pour Pb).

Au bilan, les résultats montrent qu'il existe toujours, 10 ans après la fermeture de Metaleurop Nord, une forte contamination en Cd et Pb des fractions de poussières sédimentées extérieures les plus fines avec de fortes concentrations bioaccessibles (ingestion/inhalation). Ainsi, les poussières sont une composante environnementale non négligeable à intégrer dans l'évaluation de l'exposition des jeunes enfants.

CHAPITRE III

Intégration de la bioaccessibilité dans l'évaluation des risques

III.1. Evaluation du risque en lien avec l'ingestion de particules de terre

Dans l'évaluation de l'exposition et des risques sanitaires liés aux sols pollués, l'ingestion de terre et de poussières est une des voies d'exposition majeure, notamment pour les cibles sensibles comme les enfants. Aussi, les réflexions sur l'intégration des notions de biodisponibilité/bioaccessibilité dans les études sanitaires sont basées exclusivement sur la voie orale et principalement, sur l'ingestion de particules de terre. Les doses d'exposition sont calculées sur la base de la concentration totale du polluant dans le sol alors que seule la fraction biodisponible de ce polluant est à même d'induire un effet toxique dans l'organisme. Les évaluations actuelles basées sur les concentrations totales des polluants dans les matrices concernées (terre, poussières...) ne reflètent pas la réalité d'exposition mais se fondent sur une approche simplifiée par manque de données relatives à la biodisponibilité pour l'homme des polluants des sols. Ainsi, classiquement, en cas d'ingestion de terre contaminée, la dose journalière d'exposition (*DJE*) pour la substance ingérée est calculée de la manière suivante :

$$DJE = \frac{C \times Q \times F \times T}{P \times T_m}$$

Avec :

DJE : dose journalière d'exposition (mg/kg_{pc}/jour)

C: concentration en polluant dans le sol (mg/kg)

Q : quantité de matrice ingérée (mg/jour)

P: poids corporel de la cible (kg_{pc})

F : fréquence d'exposition (jours/an)

T : durée d'exposition (an)

 T_m : période de temps sur laquelle l'exposition est moyennée (an) – si substance à effets à seuil : $T_m = T$; si substance à effets sans seuil : $T_m = 70$ ans (vie entière)

La concentration en polluant dans le sol est obtenue par la mesure. Pour les autres paramètres, les choix sont faits selon la cible et le scénario d'exposition suivant les données de la littérature (InVS, INERIS, USEPA).

Pour les substances à effets à seuil (i.e. effets non cancérigènes ou cancérigènes non génotoxiques), le risque est caractérisé par le calcul du quotient de danger (QD) en prenant en compte la valeur toxicologique de référence (VTR) selon l'équation suivante :

$$QD = \frac{DJE}{VTR}$$

Un quotient de danger inférieur ou égal à 1 signifie que l'exposition de l'individu n'atteint pas le seuil de dose à partir duquel peuvent apparaître des effets indésirables pour la santé humaine. Au contraire, un *QD* supérieur à 1 signifie que l'effet toxique peut se déclarer au sein de la cible exposée, sans qu'il soit possible d'estimer la probabilité de survenue de cet événement.

Pour les effets sans seuil (i.e. effets cancérigènes génotoxiques), il est supposé qu'à toute dose non nulle d'une substance toxique correspond une probabilité non nulle de développer un effet. Cette probabilité, appelée excès de risque individuel (*ERI*) est calculée selon l'équation suivante :

$ERI = DJE \times VTR$

L'*ERI* correspond à la probabilité supplémentaire, par rapport à un sujet non exposé, qu'un individu contracte un cancer s'il est exposé pendant sa vie entière à la dose d'exposition (*DJE*) calculée.

Dans ces conditions, l'estimation des niveaux de risque repose, pour la voie orale, sur la comparaison directe de la dose de polluant ingérée avec le sol à la *VTR* et ce, en négligeant la différence de biodisponibilité de l'élément considéré dans le sol contaminé et la matrice utilisée pour l'établissement de la *VTR*. Ne pas considérer la biodisponibilité conduit, dans la majorité des cas, à surestimer les niveaux de risque associés à l'ingestion de terre. Il est donc fondamental de considérer 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 au danger.

L'intégration de la biodisponibilité lors de l'évaluation de l'exposition intervient dans le calcul de la *DJE* comme suit :

$$DJE = \frac{C \times Q \times F \times T}{P \times T_m} \times BD$$

Avec :

BD : biodisponibilité du polluant au sein de la matrice considérée (terre, poussières) (sans unité)

La littérature insiste sur l'importance de considérer la biodisponibilité en vue d'évaluer l'impact réel sur un organisme. Depuis plusieurs années, les recherches sur la biodisponibilité des polluants pour l'homme *via* principalement l'ingestion de terre se sont développées avec la mise en place de protocoles *in vitro* en vue d'approcher la biodisponibilité par la mesure de la bioaccessibilité. L'objectif est donc d'améliorer l'estimation de l'exposition humaine par la mesure de la bioaccessibilité appliquée en tant que facteur correctif de la concentration totale du polluant. De nombreux travaux ont été recensés dans la littérature où les auteurs intègrent directement les données de bioaccessibilité des métaux mesurées dans la matrice sol (pour le paramètre *BD*) dans le calcul des *DJE* (e.g. Carrizales et al., 2006 ; Guney et al., 2010 ; Luo et al., 2012 ; Ding et Hu, 2014 ; Hamad et al., 2014 ; Li et al., 2014).

Basés sur les données de la littérature, mes premiers travaux sur les évaluations de risques en lien avec l'ingestion de particules de terre ont été réalisés sur les 34 jardins potagers présentés précédemment (cf § II.3.1 et II.3.2). Pour cette voie d'exposition, j'ai déterminé la bioaccessibilité orale de Cd et Pb au moyen du test UBM que j'ai ensuite intégrée dans l'étude sanitaire. Dans cette étude, je me suis intéressée exclusivement aux effets à seuil avec le calcul du *QD*. Ces résultats ont fait l'objet, pour partie, d'une publication [11] insérée ci-dessous.

Pelfrêne A., Douay F., Richard A., Roussel H., Girondelot B., 2013. Assessment of potential health risk for inhabitants living near a former lead smelter. Part 2: site-specific human health risk assessment of Cd and Pb contamination in kitchen gardens. Environmental Monitoring and Assessment 185, 2999-3012.

En résumé...

Cette étude avait pour objectif d'évaluer le risque potentiel pour les jardiniers et leur famille en lien avec l'ingestion de particules de terre et la consommation de légumes autoproduits et ce, dans 34 jardins contaminés aux métaux. Les doses journalières d'exposition à Cd et Pb ont été calculées pour ces deux voies en vue de calculer le quotient de danger (effets à seuil). La bioaccessibilité orale des métaux a été intégrée seulement dans le cadre de l'ingestion de particules de terre. En prenant en compte les concentrations totales de celles-ci dans les calculs de risque, les résultats ont mis en évidence que les deux voies d'exposition considérées n'entraîneraient pas d'effets délétères pour l'adulte. Par contre, pour les enfants, les quotients de danger sont souvent supérieurs à 1 (i.e. risque potentiel) avec : (1) pour Pb, des QD plus élevés avec l'ingestion de particules de terre et (2) pour Cd, des QD plus élevés pour la voie consommation de légumes. Dans le cas de l'ingestion des particules de terre, la prise en compte de la bioaccessibilité dans les calculs de risque entraîne une diminution non négligeable de la DJE et donc du QD.

Dans cet article, il a également été fait l'objet, pour chacun des 34 jardins étudiés, d'une seconde approche qui a consisté à établir un critère d'évaluation spécifique (SSAC) au moyen d'un modèle mathématique (SNIFFER³). Il s'agit de calculer, pour les deux voies d'exposition, en prenant en compte différents paramètres (cibles, paramètres d'exposition, bioaccessibilité dans le sol...), une valeur seuil (concentration en métal en mg/kg). Si la concentration mesurée dans le sol du jardin dépasse cette valeur seuil alors un risque existe. Cette méthode n'étant pas applicable à Pb, les

³ The Scotland and Northern Ireland Forum For Environmental Research (Ferguson et al., 2003)

calculs ont été réalisés uniquement pour Cd et ont été confrontés aux résultats obtenus sur les quotients de danger. Les résultats ont mis en évidence que la plupart des concentrations totales en Cd mesurées dans les sols de potager excédent les SSAC, en particulier via la consommation des légumes, même si les QD sont inférieurs à 1. Pour Cd, le calcul des SSAC représente une approche efficace mais plus conservative que la méthode basée sur le calcul du QD.

Assessment of potential health risk for inhabitants living near a former lead smelter. Part 2: site-specific human health risk assessment of Cd and Pb contamination in kitchen gardens

Aurélie Pelfrêne • Francis Douay • Antoine Richard • Hélène Roussel • Bertrand Girondelot

Received: 5 January 2012/Accepted: 25 June 2012/Published online: 13 July 2012 © Springer Science+Business Media B.V. 2012

Abstract Metal contamination of urban soils and homegrown products has caused major concern. In Part 1, we investigated the long-term effects of a former smelter on the degree of kitchen garden-soil contamination and the quality of the homegrown vegetables from these gardens. The results showed that the soils retained a high level of contamination and

A. Pelfrêne (⊠) · F. Douay
Université Lille Nord de France,
59000 Lille, France
e-mail: aurelie.pelfrene@isa-lille.fr

A. Pelfrêne · F. Douay
Groupe ISA, Equipe Sols et Environnement, Laboratoire
Génie Civil et géo-Environnement Lille Nord de France
(LGCgE),
EA 4515, 48 boulevard Vauban,
59046 Lille Cedex, France

A. Richard
Laboratoire d'Analyses des Sols, Institut National de la Recherche Agronomique,
273 rue de Cambrai,
62000 Arras, France

H. RousselDépartement Sites et Sols pollués, ADEME,21 rue du Grésillé,49000 Angers, France

B. Girondelot
Délégation Régionale Nord-Pas de Calais, ADEME,
20, rue du Prieuré,
59500 Douai, France

that a large proportion of the vegetables produced did not comply with the legislation on the levels of metals allowed for human consumption. The present study aims to assess the associated potential health risk to local inhabitants through consumption of homegrown vegetables and ingestion of soil particles using a land use-based approach. For lead (Pb), the standard hazard quotient (HQ)-based risk assessment method was used to determine the HQ. For cadmium (Cd), the approach consisted of calculating the HQs and then deriving site-specific assessment criteria (SSAC) using the SNIFFER method. The results suggested that the exposure pathways considered should not engender any form of deleterious health effects for adults. For children, Pb was the main concern and induced a relatively high health risk through soil particle ingestion, and most total soil Cd concentrations exceeded the derived SSAC, in particular, through consumption of vegetables. The metal bioaccessibility in soils was incorporated into the methods to establish more realistic risk assessment measures. This study proposes an approach to integrate different human health risk assessment methods. Further investigations should complete the assessment to improve risk determination, e.g., the determination of metal bioaccessibility in vegetables.

Keywords Risk assessment · Kitchen garden soils · Homegrown vegetables · Bioaccessibility · Metals

Introduction

Concern about potential risks from metals in urban soils has been widely expressed because of the history of soil contamination due to past industrial activity (Hough et al. 2004; Sánchez-Camazano et al. 1994; Wong 1996; Luo et al. 2011). Urban soils combine materials and associated contaminants from a wide variety of processes resulting in highly complex and heterogeneous mixtures (Wong et al. 2006). Due to the proximity of large populations, contaminated urban soils can pose significant direct risks to human health through direct ingestion of soil particles, inhalation of dust, and consumption of food plants grown in metalcontaminated soils (Cambra et al. 1999). Some studies showed that lead (Pb) and cadmium (Cd) were among the most significant hazards in kitchen garden soils (Alloway 2004), and prolonged exposure to these metals could cause deleterious health effects in humans (Reilly 1991). Cadmium exposure may adversely affect health and lead to kidney dysfunction, skeletal disorders, and respiratory problems and also affect bone and cause fractures (Jarup 2003). Lead poisoning is one of the most common and bestrecognized childhood diseases of toxic environmental origin, and pre-school children may experience longlasting adverse neurobehavioral effects (Jarup 2003; Oliver 1997). In the early 1990s, the United States Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention defined a pediatric blood concentration Pb level of 10 μ g dL⁻¹, the level that remains to this day. However, many authors have provided evidence for neurodevelopmental and other systemic effects of Pb at levels below 10 μ g dL⁻¹ and suggested that this current level may not be adequately protective of children's health (Bellinger and Needleman 2003; Canfield et al. 2003; Kordas et al. 2006; Lanphear et al. 2005; Surkan et al. 2007).

In the North of France, soil quality is a major concern, especially in the former coal mining areas, due to the past industrial context and the strong demographic pressure (about 600 inhabitants per square kilometer). In this area, the emissions generated by the former Metaleurop Nord lead smelter have severely contaminated the surrounding soils (Sterckeman et al. 2000, 2002). After more than a century of activity, and 7 years after the Metaleurop Nord smelter closedown, the urban topsoils located around this former smelter are severely contaminated by Cd and Pb, and a high percentage of the vegetables produced in the kitchen gardens of the surrounding area do not comply with the European foodstuff legislation (Douay et al. 2012). Excessive accumulation of Cd and Pb in these soils is of great concern because of potential health risk to the local inhabitants. Reviewing the research in human health risk assessment, Ferguson (1996) concluded that, for there to be a risk to human health, there had to be a source of contamination, one or more pathways along which the contaminants could travel, and one or more humans who might be affected by that contamination.

The objective of the present study was to assess the associated potential risk for inhabitants (adults and children) living in the zone highly affected in the past by the Metaleurop Nord dust emissions and exposed through ingestion of soil particles and consumption of the homegrown vegetables. The health risk evaluation process involved the identification of: (1) land use, the analysis of contaminant concentration and its bioavailability, (2) exposed populations (in particular, occupancy by children), and (3) potential exposure pathways and the state of the site's surface (e.g., paved, with grass, or exposed) (Ferguson et al. 1998; Poggio et al. 2008; USEPA 1998). Land use influences the selection of the parameters, i.e., exposure scenarios, frequency, and pathways. Due to the complexity of the system, it is difficult to establish limit values for contaminant concentrations beyond which human health risks are considered to be unacceptable and to define unacceptable risk (Grasmuck and Scholz 2005; Scholz and Schnabel 2006). Several methods were developed to assess the health risks attributable to soil pollution and to establish guidelines for site remediation (e.g., Earl et al. 2005; Ferguson et al. 2003; Fryer et al. 2004; Strikwold and Smit 2003; Thompson 1998). The approaches of these models are comparable; however, the input parameters and scenarios are different. The results obtained are therefore often not comparable.

The aim of this study was therefore to propose an approach that integrates different methods of human health risk assessment. This study focuses in particular on estimating the potential level of human health risks associated with chronic exposure to Cd and Pb in 34 kitchen garden soils through ingestion of soil particles and consumption of homegrown vegetables. A questionnaire on dietary consumption of vegetables was administered to obtain site-specific exposure parameters, and the health risk was assessed by using two different approaches. The first approach, the standard hazard quotient (HQ)-based risk assessment method (USEPA 2007), is based on the determination of the HQ and consisted of comparing estimated daily intake with a tolerable daily intake. In the second approach, the SNIFFER (the Scotland and Northern Ireland Forum For Environmental Research) method was adapted to reflect the conditions in the North of France and was used to derive site-specific health assessment criteria for contaminants in soil (Ferguson et al. 2003).

Materials and methods

Site description and sampling

The risk assessment mainly focused on residential areas in the vicinity of the former Metaleurop Nord smelter. After a door-to-door survey, 34 kitchen gardens (named KG-1 to KG-34) were selected for which (Douay et al. 2012): (1) a questionnaire was administered in April-May 2010 to determine gardeners' practices; (2) at least one soil profile (up to 120 cm) was determined using a hand auger to characterize each garden (i.e., heterogeneity, complexity, presence, and relative quantity of anthropogenic material, etc.); (3) the average contamination level of the topsoil (0-25 cm deep) was assessed with one composite sample comprising at least 20 subsamples for each garden. From the questionnaire, the main vegetables produced and selected included radish, lettuce, French bean, carrot, leek, tomato, and potato. The gardeners received the same vegetable cultivars (seeds and seedlings) in order to reduce variability in metal accumulation within species. They had full responsibility for growing them. Vegetables were sampled

Table 1Mean values and stan-
dard deviations (SD) of Cd and
Pb concentrations in the kitchen
garden soils (milligrams per ki-
logram of dry weight) and in the
homegrown vegetables (milli-
grams per kilogram of fresh
weight)

at their consumption stages, taking care to obtain a representative sample. At each sampling plot, paired vegetable and soil (0–25 cm depth) samples were collected. From three to seven random soil samples on each plot were taken and bulked together as one composite sample. Two hundred seven samples of vegetables and corresponding soil samples were collected from the 34 kitchen gardens and packed into polyethylene bags. The sample preparation and soil and vegetable analysis are described in Douay et al. (2012). Table 1 presents the mean values and the standard deviations of Cd and Pb concentrations measured in the kitchen garden soils and in the edible parts of homegrown vegetables. These data were presented and discussed in Douay et al. (2012).

Because of gardening crop failures, certain vegetables were missing in some kitchen gardens. Therefore, to complete the risk assessment, the 31 missing data on metal concentrations in homegrown vegetables were extrapolated from linear correlations observed between vegetable concentrations and soil concentrations (Douay et al. 2012).

Exposure assessment under a site-specific scenario

From the questionnaire, a site-specific exposure scenario was determined, including site-specific environmental and exposure parameters, which matched the local lifestyle of the area studied. The objective was to simulate the exposure processes as close to the actual situations as possible. The data recorded included the garden's characteristics (age, surface area, gardening practices, etc.), the type of home-produced vegetables, the frequency of vegetable consumption, the age and gender of the gardeners, and the number of family members. Approximately 65 % of gardeners aged

	Cd Mean	SD	Pb Mean	SD
Soils (<i>n</i> =207)	8.3	4.4	565	379
Homegrown vegetables				
Radish ($n=34$)	0.12	0.08	0.15	0.09
Lettuce $(n=33)$	0.39	0.39	0.15	0.16
French bean $(n=32)$	0.01	0.01	0.06	0.05
Carrot $(n=28)$	0.15	0.09	0.21	0.13
Potato (n=30)	0.17	0.07	0.07	0.02
Leek (<i>n</i> =26)	0.16	0.10	0.09	0.05
Tomato (n=24)	0.04	0.02	0.04	0.06

60 years or over continued to fully participate in gardening. Children were identified as the most sensitive receptor because their intakes of food, water, air, and soil are greater per unit of body weight than adults. For this scenario (i.e., urban residential with homegrown vegetables), (1) the major soil exposure receptors were assumed to be adults and children, and (2) the exposure pathways considered relevant included direct ingestion of soil particles and consumption of homegrown vegetables (Fig. 1). Because the edible parts of vegetables were peeled if necessary and meticulously washed, the ingestion of soil particles attached to vegetables was not included in the scenario. Moreover, it was justifiable to exclude inhalation of indoor and outdoor soil-derived dust and dermal pathways, which are now considered minor pathways because of the smelter closedown.

For ingestion of soil particles, the exposure duration considered was 70 years for adults (equivalent to the average lifetime) and 6 years for children (from 0 to 6 years). The body weight for French adults and children in this area were 55.79 and 11.15 kg, respectively, which correspond to the mean of the fifth percentile body weights over the exposure duration considered (de Saint Paul 2006). For each garden, two types of soil sampling were carried out: (1) one composite soil sample to provide an estimate of average soil metal concentration and (2) one composite soil sample collected each time the homegrown vegetables were sampled to determine the bioaccumulation factors as well as the range in metal levels in each kitchen garden (Douay et al. 2012). In this study, the risk through soil particle ingestion was assessed by considering the average soil concentration of Cd and Pb in each kitchen garden.

For vegetable ingestion, the consumers were assumed to be both adults and children. The garden characteristics, the type of home-produced vegetables, and the age, gender, and number of family members were provided in the questionnaire. However, the time-averaged vegetable consumption rate (TAVCR; Fig. 1) and the homegrown fraction of vegetables consumed (HF; Fig. 1) were from a French INSEE (National Institute of Statistics and Economic Studies) survey carried out in northern France (Bertrand 1993). Since 1993, dietary habits have probably changed. However, in the absence of any recent and full data on dietary habits of northern French consumers, we used the data recorded by Bertrand (1993).

Risk characterization

Total human exposure to Cd and Pb was estimated as the sum of two different routes: direct (i.e., incidental ingestion of soil particles) and dietary (i.e., consumption of homegrown vegetables) exposure. The risk associated with chronic exposure to metals in the 34 kitchen garden soils was assessed using two different methods: (1) the standard HQ-based risk assessment method (USEPA 2007) and (2) the SNIFFER method (Ferguson et al. 2003).

In the first method, the potential noncarcinogenic risk for Cd and Pb was expressed as the HQ. Index doses (to assess cancer risk) for Cd and Pb were not determined due to lack of slope factor information for oral exposure. A HQ is defined as the ratio of the estimated contaminant exposure (the estimated daily intake (EDI)) to the tolerable daily intake (TDI). If the ratio is less than 1.0, the exposed population is unlikely to experience obvious adverse effects. However, if the HQ is higher than 1.0, the contaminant may produce an adverse effect. TDI is the oral reference dose, which is an estimation of maximum permissible risk on a human population through daily exposure during a lifetime. For Cd, TDI was based on 1E-03 mg kg⁻¹ body weight day⁻¹ (USEPA 2007). For Pb, the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) established a tolerable weekly intake of 0.025 mg kg^{-1} body weight week⁻¹ (i.e., 3.5E-03 mg kg⁻¹ body weight day⁻¹) for infants and children and extended it to people in all age groups (JECFA 1993). In June 2010, JECFA re-evaluated this level for children and withdrew the provisional tolerable weekly intake guideline value, which was inadequate to protect against intelligence quotient (IQ) loss. Indeed, it is estimated that 0.5 IQ point is lost for a daily intake of 3E-04 $\mu g \ kg^{-1}$ body weight for children (0-4 years), and an increase of 9E-03 μ g kg⁻¹ body weight day⁻¹ is associated with a 3.0 IQ point decrement (JECFA 2010). In the present study, for children, we chose a TDI of 3E-04 mg kg⁻¹ body weight day⁻¹, which provides a more conservative assessment. For adults, we retained the TDI of 3.5E-03 mg kg⁻¹ body weight

Step 1: Collect input data- Tolerable Daily Intakea (TDI) = 1×10^{-3} - Mean Daily Intakeb (MDI) = $17 \ \mu g \ dar$	mg kg ⁻¹ body weigl y ⁻¹	nt day ⁻¹	
Step 2: Select land use \rightarrow Residential with plant uptake		Adults	Children
Land use fixes ^c :		70	ć
- Exposure Duration (ED, years)		70	6 2100
- Averaging Time (AI, days)		25550	2190
- Clinanoou Factor (CF, dintiess)	 1)	1	0.465
- Exposure Frequency (EF, days year) - Time-Averaged Body Weight (TABW, kg)			11.15
$\underbrace{\text{Step 3: Select exposure pathway}}_{\leftarrow} \xrightarrow{\rightarrow} \underbrace{\text{Direct soil and dust ingestion}}_{\leftarrow} \underbrace{\text{Consumption of homegrown}}_{\leftarrow}$	n vegetables		
Step 4: Calculate Reference Intake (RI)			
Step 5: Calculate Soil equivalent Intake (SEI)			
SEI calculated for every exposure pathway using default values		Adults	Children
1) Direct soil and dust ingestion:			
- Time-Averaged Soil and Dust ingestion Rate ^c (TASDR, kg soil d	ay-1)	6x10 ⁻⁵	1x10 ⁻⁴
2) Consumption of vegetables:	Radish	0.010	0.006
- Time-Averaged Vegetable Consumption Rated	Lettuce	0.010	0.006
(TAVCR, kg fresh weight vegetables day ⁻¹)	French bean	0.007	0.004
	Carrot	0.022	0.013
	Potato	0.190	0.171
	Leek	0.013	0.008
	Tomato	0.025	0.015
- Homegrown Fraction of vegetables consumed ^d (HF, unitless)	Radish	0	.173
	Lettuce	0	.173
	French bean	0	.639
	Carrot	0	.308
	Potato	0	.104
	Leek	0	.330
	Tomato	0.	.094
Vagatable/Soil Concentration Factor			
- vegetable/Soll Collectification Factor (CF _{war} up Cd σ^{-1} fresh weight plant per up Cd σ^{-1} dry weight so	il)		
(crycg, µg cu g mesh weight plant per µg cu g ury weight so	**/		

(Step 6: Calculate Assessment Sub-Criterion for each exposure pathway (ASC)

(Step 7: Calculate Site-Specific Assessment Criteria (SSAC)

^aUSEPA, IRIS 2007; ^bDGAL 2000; ^cFerguson et al. 2003; ^dBertrand 1993

Fig. 1 Schematic overview of how SSAC was derived for the present study (adapted from Ferguson et al. 2003)

day⁻¹ established by JECFA. The following equations were used to determine the two exposure pathways of Cd and Pb:

$$HQ_{soil or veg} = \frac{EDI_{soil or veg}}{TDI}$$
(1)

$$EDI_{soil} = \frac{C_{S} \times TASDR \times EF \times ED \times BAF}{TABW \times AT}$$
(2)

$$EDI_{veg} = \frac{\sum (C_{veg} \times TAVCR \times HF) \times EF \times ED}{TABW \times AT}$$
(3)

where EDI_{soil or veg} is the estimated daily intake through soil particle ingestion or homegrown vegetable consumption; $C_{\rm S}$ is the metal concentration in soil (milligrams per kilogram); C_{veg} is the metal concentration in vegetables (milligrams per kilogram, fresh weight); TASDR is the time-averaged soil and dust ingestion rate (6E-05 and 1E-04 kg soil day⁻¹ for adults and children, respectively); EF is the exposure frequency $(365 \text{ days year}^{-1})$; ED is the exposure duration (70 and 6 years for adults and children, respectively); BAF is the bioaccessible fraction for soil (unitless); TABW is the time-averaged body weight (55.79 and 11.15 kg for adults and children, respectively); AT is the averaging time (25,550 and 2,190 days for adults and children, respectively); TAVCR is the time-averaged vegetable consumption rate (kilograms of fresh weight vegetables per day); HF is the homegrown fraction of vegetables consumed (unitless).

The total hazard quotient (THQ) was calculated as the sum of the HQs of the pathways for each metal.

$$THQ = \sum (HQ_{soil} + HQ_{veg})$$
(4)

The HQ-based risk assessment method provides the simplest indication of the risk level due to pollutant exposure and does not provide a quantitative estimate of the probability of an exposed population experiencing a reverse health effect.

In the second method, the SNIFFER model was used to derive site-specific health assessment criteria for contaminants in soils (Ferguson et al. 2003). Among the various human health risk assessment models identified in the literature, we considered several criteria to choose an appropriate model to reflect French conditions, i.e., ease of modification, cost, model usability, and consideration of metal bioaccessibility. The site-specific assessment criterion (SSAC) represents the contaminant concentration in soils, which if exceeded may be indicative of unacceptable risks to human health. However, the SNIFFER method is not suitable for Pb (Ferguson et al. 2003) and was developed based on the UK default land use scenarios and its human receptors. In the present study, the SSAC was calculated only for Cd in each kitchen garden in order to establish whether an unacceptable risk to human health exists. For the homegrown vegetable consumption pathway, the method was adapted to scenarios in northern France. A schematic overview of the derivation SSAC is illustrated in Fig. 1, and the detailed derivation process is provided in Ferguson et al. (2003). The reference intake (RI; in milligrams per kilogram body weight per day) for the ingestion pathway was calculated using the Eq. 5:

$$RI = TDI - \frac{\left(\frac{MDI}{70} \times 55.79\right) \times CF}{TABW}$$
(5)

Definitions of abbreviations are given below (Fig. 1).

The assessment subcriterion for intake via direct soil particle ingestion (ASC_{soil} , milligrams of contaminant per kilogram of soil) and via consumption of homegrown vegetables (ASC_{veg} , milligrams of contaminant per kilogram of soil) are calculated from:

$$ASC_{soil or veg} = \frac{RI}{SEI_{soil or veg}}$$
(6)

where SEI_{soil} and SEI_{veg} (kilograms of soil per kilogram of body weight per day) are the soil equivalent intake values calculated using Eqs. 7 and 8:

$$SEI_{soil} = \frac{TASDR \times ED \times EF \times BAF}{TABW \times AT}$$
(7)

$$SEI_{veg} = \frac{\sum (TAVCR \times HF \times CF_{veg}) \times ED \times EF}{TABW \times AT}$$
(8)

For each kitchen garden studied, the integrated SSAC (milligrams per kilogram of soil) is calculated using Eq. 9:

$$\frac{1}{\text{SSAC}} = \left(\frac{1}{\text{ASC}_{\text{soil}}}\right) + \left(\frac{1}{\text{ASC}_{\text{veg}}}\right) \tag{9}$$

The bioaccessibility of metal in the soil ingestion process was incorporated into both methods. The
bioaccessibility of Cd and Pb was measured in a composite soil sample from each of the 34 kitchen gardens (Douay et al. 2012). The Unified Bioaccessibility Method (UBM; Wragg et al. 2011), developed by the Bioaccessibility Research Group of Europe, was employed. Details for the preparation of simulated digestive fluids and for the procedure of the in vitro test are presented elsewhere (Pelfrêne et al. 2011; Roussel et al. 2010). The UBM test consisted in two parallel sequential extraction phases: the gastric and gastrointestinal phases. Previous studies provided evidence for a sharp decrease in bioaccessible Cd and Pb as they moved from the gastric fluid phase to the intestinal fluid phase (Denys et al. 2007; Ellickson et al. 2001; Roussel et al. 2010). The metal's bioaccessible fraction in the gastrointestinal phase is more physiologically relevant. However, for human health risk assessment, the metal's bioaccessible fraction in the gastric phase would provide a more conservative assessment. Consequently, only the gastric results are presented here and were used for both risk assessment methods because they give a good estimate of the maximum amounts of metals that are likely to be bioaccessible and therefore provide a conservative estimation of risk.

Results and discussion

Daily intake of Cd and Pb via homegrown vegetable consumption

The daily intake of Cd and Pb from homegrown vegetables was calculated for adults and children according to the average metal concentrations in vegetables (i.e., C_{veg} in milligrams per kilogram, fresh weight) and the average amounts of vegetables (i.e., TAVCR×HF in kilograms per day; Fig. 1) that local inhabitants consume.

For adults, (1) the daily intake of metals from all vegetables studied ranged from 0.03 to 7.03 μ g day⁻¹ for Cd and from 0.02 to 4.07 μ g day⁻¹ for Pb; (2) the daily intake of Cd was found to be lowest for French bean and tomato (mean, 0.06 and 0.09 μ g day⁻¹, respectively) and highest for potato (mean, 3.33 μ g day⁻¹); and (3) the daily intake of Pb was found lowest for tomato (mean, 0.05 μ g day⁻¹) and highest for carrot and potato (mean, 1.39 and 1.05 μ g day⁻¹, respectively) (Table 2). Potato was the highest contributor for Cd intake with 55 % of the total intake, followed by carrot, leek, and lettuce with 16 %, 13 %, and 10 %, respectively, and the highest contributions to the daily intake of Pb came from carrot and potato, with 36 % and 30 %, respectively.

Vegetable	Daily intake of Cd (µg day ⁻¹)			Daily intake of Pb (μ g day ⁻¹)			
	Min	Max	Mean	Min	Max	Mean	
Adults							
Radish	0.05	0.63	0.20	0.05	0.76	0.26	
Lettuce	0.08	2.89	0.67	0.05	1.24	0.25	
French bean	0.02	0.18	0.06	0.09	1.28	0.24	
Carrot	0.27	2.57	1.00	0.34	4.07	1.39	
Potato	1.36	7.03	3.33	0.59	1.98	1.05	
Leek	0.17	3.95	0.78	0.12	2.82	0.48	
Tomato	0.03	0.17	0.09	0.02	0.50	0.05	
Children							
Radish	0.03	0.38	0.12	0.03	0.45	0.16	
Lettuce	0.05	1.73	0.40	0.03	0.75	0.15	
French bean	0.01	0.10	0.03	0.05	0.73	0.14	
Carrot	0.16	1.52	0.59	0.20	2.40	0.82	
Potato	1.22	6.33	3.00	0.53	1.78	0.95	
Leek	0.11	2.43	0.48	0.07	1.74	0.30	
Tomato	0.02	0.10	0.05	0.01	0.30	0.03	

Table 2 Daily intake of Cd andPb (micrograms per day) foradults and children from home-grown vegetable consumption

For children, (1) the daily intake of metals from vegetables ranged from 0.01 to 6.33 μ g day⁻¹ for Cd and from 0.01 to 2.40 μ g day⁻¹ for Pb; (2) the lowest daily intake of Cd came from French bean and tomato (mean, 0.03 and 0.05 μ g day⁻¹, respectively) and the highest value was for potato (mean, 3.00 μ g day⁻¹); and (3) the lowest daily intake of Pb was found for tomato (mean, 0.03 $\mu g \text{ day}^{-1}$) and the highest for potato and carrot (mean, 0.95 and 0.82 µg day⁻¹, respectively) (Table 2). For children, the contribution of vegetables to metal intake was globally similar to adults: Potato was the highest contributor for Cd intake with 64 % followed by carrot, leek, and lettuce with 13 %, 10 %, and 8 %, respectively, and the highest contributions to the daily intake of Pb came from carrot and potato with 34 %.

The HQ-based risk assessment method

Estimated daily intake through soil particle ingestion and the role of bioaccessibility data

Two different scenarios were considered to make risk calculations. The first assumed that 100 % of metals in soil particles ingested by adults and children were bioaccessible (i.e., the BAF was equal to 1). This is a conservative assumption and one that is commonly used when bioaccessibility data are not available during risk assessment. For this scenario, the estimated daily intake was called EDI_{soil}. In the second scenario, the bioaccessibility of Cd and Pb was incorporated into risk calculations by modifying the BAF in Eq. 2. It assumed that only a fraction of metals in soil particles ingested by inhabitants was bioaccessible (i.e., the BAF corresponds to the ratio between the bioaccessible and total concentrations). The estimated daily intake was called EDI_{soil} (G) and corresponds to the gastric results. Bioaccessible Cd and Pb, and EDI_{soil} and EDI_{soil} (G) values calculated for adults and children via ingestion of soil particles are presented in Table 3.

In vitro bioaccessibility of Cd and Pb measured in the 34 kitchen garden soil samples ranged, respectively, from 2.1 to 15.4 and 123 to 1024 mg kg⁻¹ of soil. The mean values of the bioaccessible fractions of Cd and Pb during the gastric phase were 76 ± 4 % and $67\pm$ 5 %, respectively, of the total concentrations in the soils. These results were consistent with those reported by Roussel et al. (2010) on the area studied. The results for Cd showed that (1) the EDI ranged from 0.003 to 0.023 μ g kg⁻¹ day⁻¹ for adults and from 0.025 to 0.189 μ g kg⁻¹ day⁻¹ for children, and (2) the EDI (*G*) values for adults and children were a mean 1.4-fold lower than EDI (Table 3). Similar results were observed for Pb: (1) The EDI ranged from 0.20 to 1.53 μ g kg⁻¹ day⁻¹ for adults and from 1.70 to 12.78 μ g kg⁻¹ day⁻¹ for children, and (2) for adults and children, the EDI (*G*) were a mean 1.5-fold lower than EDI (Table 3). Introduction of the bioaccessible fraction of Cd and Pb from soils into exposure calculations led to a slight decrease in calculated risk.

Health risk-based HQ through soil particle ingestion and homegrown vegetable consumption

The HQs of Cd and Pb through soil particle ingestion and homegrown vegetable consumption for the local inhabitants (adults and children) were calculated by considering the bioaccessible fraction and are listed in Table 4. In this study, we considered the EDI (G)based on the bioaccessible fraction of metal in soils rather than the EDI based on total concentrations, which is less representative of what is actually available for human internal assimilation (Brandon et al. 2006). The proportion of the HQ attributable to both exposure pathways varied depending on the metal. The contribution from soil ingestion was lowest for Cd (under 15 % of the THQ for adults and children), while vegetable consumption contributed over 85 % of the THQ for adults and children, as reported by Millis et al. (2004). For Pb, the greatest percentage of HQs was attributable to soil ingestion (over 90 % of the THQ for adults and children), which is in accordance with previous study results (Man et al. 2010; Wang et al. 2011). These results can also be explained by the lower phytoavailability of Pb than Cd. Indeed, it has previously been shown in the homegrown vegetables studied that the mean transfer factor (TF) for Cd was 92 times greater than the mean TF for Pb, and the TF values for Pb were very low (<0.007) because it was much more difficult for Pb to transfer from soil to the edible parts of the vegetables (Douay et al. 2012). It has previously been established that Pb particles were mainly bound to the cuticle of the plant. Therefore, efficient washing or peeling of the vegetables reduces the amount of Pb contained in them.

For adults, the THQs for Cd and Pb through both exposure pathways were less than 1.0 (<0.22 for Cd

Table 3 Total concentrations of Cd and Pb in soils (C_s , milligrams per kilogram), bioaccessible Cd and Pb values (milligrams per kilogram), calculated values (micrograms per kilogram per day) of estimated daily intake (EDI_{soil}) , and bioaccessible estimated daily intake in the gastric phase (EDI_{soil}) (*G*)) for adults and children

					Cd				Pb			
	C _s Bioaccessible metal		Adults		Children	Children		Adults		Children		
	Cd mg kg	g^{-1}	Cd mg kg ⁻¹	Pb	EDI _{soil} μg kg ⁻¹	$ \begin{array}{c} \operatorname{EDI}_{\operatorname{soil}}\left(G\right) \\ \operatorname{day}^{-1} \end{array} $	EDI _{soil}	$EDI_{soil}(G)$	EDI _{soil} µg kg ⁻¹	$ \begin{array}{c} \operatorname{EDI}_{\operatorname{soil}}\left(G\right) \\ \operatorname{day}^{-1} \end{array} $	EDI _{soil}	$\mathrm{EDI}_{\mathrm{soil}}\left(G\right)$
KG-1	7.1	436	5.6	297	0.008	0.006	0.064	0.050	0.47	0.32	3.91	2.66
KG-2	8.9	542	6.2	350	0.010	0.007	0.080	0.056	0.58	0.38	4.86	3.14
KG-3	6.3	367	4.7	229	0.007	0.005	0.057	0.042	0.39	0.25	3.29	2.05
KG-4	5.1	343	4.0	230	0.005	0.004	0.046	0.036	0.37	0.25	3.08	2.06
KG-5	6.1	363	4.8	247	0.007	0.005	0.055	0.043	0.39	0.27	3.26	2.22
KG-6	3.8	214	2.9	135	0.004	0.003	0.034	0.026	0.23	0.15	1.92	1.21
KG-7	12.6	890	9.5	627	0.014	0.010	0.113	0.085	0.96	0.67	7.98	5.63
KG-8	7.7	482	5.6	293	0.008	0.006	0.069	0.050	0.52	0.32	4.32	2.63
KG-9	7.7	453	5.5	295	0.008	0.006	0.069	0.049	0.49	0.32	4.06	2.65
KG-10	7.7	465	6.1	343	0.008	0.007	0.069	0.054	0.50	0.37	4.17	3.08
KG-11	14.7	1046	11.5	737	0.016	0.012	0.132	0.103	1.12	0.79	9.38	6.61
KG-12	10.3	598	8.1	392	0.011	0.009	0.092	0.072	0.64	0.42	5.36	3.51
KG-13	12.6	1410	8.9	914	0.014	0.010	0.113	0.080	1.52	0.98	12.65	8.20
KG-14	4.3	278	3.3	169	0.005	0.004	0.039	0.030	0.30	0.18	2.49	1.51
KG-15	2.8	209	2.1	141	0.003	0.002	0.025	0.019	0.22	0.15	1.87	1.27
KG-16	7.3	510	5.4	342	0.008	0.006	0.065	0.049	0.55	0.37	4.57	3.07
KG-17	12.7	742	9.7	470	0.014	0.010	0.114	0.087	0.80	0.51	6.65	4.21
KG-18	10.5	533	7.1	382	0.011	0.008	0.094	0.064	0.57	0.41	4.78	3.42
KG-19	21.1	1425	15.4	1024	0.023	0.017	0.189	0.138	1.53	1.10	12.78	9.19
KG-20	19.3	1061	13.9	663	0.021	0.015	0.173	0.125	1.14	0.71	9.52	5.95
KG-21	10.6	676	8.1	462	0.011	0.009	0.095	0.073	0.73	0.50	6.06	4.15
KG-22	3.9	190	2.8	123	0.004	0.003	0.035	0.025	0.20	0.13	1.70	1.11
KG-23	7.5	475	6.3	339	0.008	0.007	0.067	0.056	0.51	0.36	4.26	3.04
KG-24	4.6	226	3.5	155	0.005	0.004	0.041	0.031	0.24	0.17	2.03	1.39
KG-25	7.5	477	5.8	306	0.008	0.006	0.067	0.052	0.51	0.33	4.28	2.75
KG-26	6.5	420	5.1	284	0.007	0.006	0.058	0.046	0.45	0.31	3.77	2.54
KG-27	5.7	326	4.5	218	0.006	0.005	0.051	0.040	0.35	0.23	2.92	1.96
KG-28	4.4	224	3.6	165	0.005	0.004	0.039	0.032	0.24	0.18	2.01	1.48
KG-29	4.6	239	3.6	164	0.005	0.004	0.041	0.032	0.26	0.18	2.14	1.47
KG-30	6.8	295	5.3	141	0.007	0.006	0.061	0.047	0.32	0.15	2.65	1.26
KG-31	6.4	462	5.1	269	0.007	0.005	0.057	0.045	0.50	0.29	4.14	2.41
KG-32	8.4	507	6.6	373	0.009	0.007	0.075	0.060	0.55	0.40	4.55	3.35
KG-33	4.8	274	4.1	210	0.005	0.004	0.043	0.037	0.29	0.23	2.46	1.88
KG-34	10.8	725	8.2	470	0.012	0.009	0.097	0.074	0.78	0.51	6.50	4.22

and <0.33 for Pb), suggesting that these pathways are not a risk for these metals (Table 4). For children, the HQ values were notably higher than for adults. For both exposure pathways, the THQ of Cd was less than 0.85. For Pb, considering only soil particle ingestion, all the soils provided a HQ greater 1.0, with a mean

HQ of 10.5, whereas considering only vegetable consumption, 21 % of the kitchen gardens provided a HQ greater than 1.0. For both exposure pathways, the THQ of Pb ranged from 4.1 to 31.9 (Table 4).

Using the HQ-based risk assessment method, the results suggested that the two exposure pathways considered should not engender any form of deleterious health effects for adults living in the vicinity of the former smelter. However, the results were different for children: (1) the Pb levels in the soils studied were the main concern, and they were subjected to a relatively high health risk, in particular, through soil particle ingestion; and (2) the health risks of Cd exposure through soil particle ingestion and homegrown vegetable consumption were generally assumed to be safe.

Risk through soil particle ingestion was first assessed by considering the average soil concentrations of Cd and Pb in kitchen gardens (Table 3). However, in a previous study (Douay et al. 2012), we provided evidence for heterogeneity of metal distribution, over a relatively short distance, within each kitchen garden. Thus, the HQs of Cd and Pb through soil ingestion were estimated by considering the range of metal concentrations. Significant variations were observed (data not presented here). However, the conclusions remained the same as the previous, i.e., a THQ for Cd <1.0 for adults and children, a THQ for Pb <1.0 for adults, and THQ of Pb >>1.0 for children. In this study, the HQ method reflected only the potential noncarcinogenic risk for Cd and Pb. However, Cd is also a carcinogen, but cancer risk was not determined due to lack of information for oral exposure.

Site-specific assessment criteria for Cd using the SNIFFER method

We focused on more detailed site-specific assessment criteria for the kitchen garden soils using the SNIFF-ER method (Ferguson et al. 2003). This model is a deterministic risk assessment tool that combines information on the toxicity of soil contaminants and estimates potential exposure for adults and children in a variety of exposure scenarios (Cheng and Nathanail 2009; Nathanail et al. 2005). The SNIFFER model was adapted to reflect the conditions in northern France (i.e., dietary habits obtained from the questionnaire and from the French INSEE survey) and the local land use (residential with plant uptake), receptor (adults and children), and chemical data were entered so as to assess the risks posed by Cd at each site, given that this model allows the inclusion of bioaccessibility in generating more detailed SSAC.

The SNIFFER method was applied in several steps (Fig. 1). Step 1 identified the input data (TDI and mean daily intake (MDI)). TDI is an estimate of the amount of a contaminant that can be ingested daily over a lifetime without appreciable health risk and is 1E-03 mg kg⁻¹ body weight day⁻¹ (USEPA 2007). MDI corresponds to the average background intake (e.g., food, water, air) to which that population may be exposed. The average daily intake of Cd (17 μ g day⁻¹) was derived based on a French study (DGAL 2000). Steps 2 and 3 identified the land use and the exposure pathways. The "residential with plant uptake" use was considered with direct soil ingestion and consumption of homegrown vegetables. For this land use, we fixed the exposure duration,

Table 4 Estimated hazard quo-
tient (HQ) for Cd and Pb through
soil particle ingestion and
homegrown vegetable consump-
tion and total hazard quotient
(THQ) through both exposure
pathways

Cd Pb Min Max Mean Min Max Mean Adults Soil ingestion 0.002 0.02 0.01 0.04 0.31 0.11 Vegetable consumption 0.020 0.20 0.10 0.01 0.02 0.01 THO 0.022 0.22 0.11 0.05 0.33 0.12 Children Soil ingestion 0.02 0.14 0.06 3.7 30.6 10.5 Vegetable consumption 0.20 0.71 0.42 0.41 1.32 0.76 THQ 0.22 0.85 0.48 4.1 31.9 11.3

averaging time, the childhood factor, exposure frequency, and time-averaged body weight, based on Ferguson et al. (2003) (Fig. 1). In step 4, the RI was calculated using Eq. 5. RI is the amount of Cd that can be taken in from the site's soil, such that the relevant health criteria of that contaminant are not exceeded. The RI values were 7.57E-4 and 4.11E-4 mg kg⁻¹ body weight day⁻¹ for adults and children, respectively. From steps 5–7, the soil equivalent intakes (SEI_{soil} and SEI_{veg}) and the assessment sub-criterion (ASC_{soil} and ASC_{veg}) were calculated for both exposure pathways in order to generate the SSAC. The resultant SSAC values for the 34 sites are listed in Table 5 and varied from 27.1 to 112.7 mg kg⁻¹ for adults and from 3.7 to 13.6 mg kg⁻¹ for children.

The resultant SSAC values for the 34 sites were compared with the average soil Cd concentrations and the range of Cd concentrations (Table 5) in order to (1) establish whether an unacceptable risk to human health exists and (2) know whether the heterogeneity observed affects metal intake, especially from the point of view of human health risk assessment. Of the 34 kitchen garden soils, none had a total Cd concentration above the derived SSAC for adults (Table 5). However, for children, the mean Cd concentrations of 17 soils exceeded the derived SSAC, whereas by considering the range of Cd concentrations, seven other soils exceeded it (Table 5). These 24 sites appeared to pose an unacceptable risk to children's health (critical receptor), and the observed heterogeneity of Cd concentrations within the studied soils showed important effects on exposure assessment.

Health risk to local inhabitants and consequences on kitchen garden management

From the data produced in the present study, adults should not experience any form of deleterious health effects through soil particle ingestion and homegrown vegetable consumption, whereas the results were different for children, a critical receptor. In addition, the approach was based on only two exposure pathways, and other sources were not considered in the risk assessment (e.g., dust inhalation, additional contaminated food such as home-produced eggs or poultry, lead paint, industrial exposure, cigarettes, etc.).

In the absence of any available published assessment criteria on French land use, the SNIFFER method could be used for Cd, as a preliminary approach, to derive SSAC for kitchen garden soils. In deciding whether the results of this deterministic approach are sufficient for decision-making, the magnitude of the risk estimates (i.e., the HQ values) may be considered in a more detailed approach.

The SNIFFER method provided evidence that most kitchen gardens appeared to pose an unacceptable risk for Cd to children's health. Using the HQ-based risk assessment method, the health risks of Cd exposure through soil ingestion and homegrown vegetable consumption were assumed to be safe for the local inhabitants (THQ<0.82). Comparison of the two methods provided evidence that the average total soil Cd concentrations exceed the derived SSAC when THQ>0.50 (Table 5). Usually, the guideline values (such as SSAC) are designed to be cautious and protective of a very wide range of site conditions, as well as receptor characteristics and behaviors (Nathanail 2006). Therefore, in cases where soil Cd concentrations do not exceed the guideline value, no further action is considered, but, in some cases where soil concentrations exceed the SSAC value (even if THQ<1.0), some effective measures may be considered. Moreover, the results obtained with the HO-based risk assessment method showed that Pb posed a potential risk to children through ingestion of contaminated soils in all the kitchen gardens studied. Consequently, actions are necessary to reduce metal exposure to local inhabitants.

An important goal in human health risk assessment is to provide assistance to policy makers. For the site where the risk was identified as unacceptable, the management options have to define how to minimize risk in a cost-effective way. The risk to human health can be reduced by interrupting the source-receptor pathway. A solution is to replace contaminated soil with clean soil, as reported by Douay et al. (2008) in the same study area. Another option is sealing the soil surface. However, these kinds of remediation are expensive and difficult to apply. A more cost-effective solution may be changing land use to a less sensitive use or a change in some characteristics of the actual land use in order to break the exposure pathways (e.g., ceasing the gardening activity). Because the uncovered soils can be a source of contamination by dust emissions, the kitchen garden soils could be stabilized by grass. This last option would reduce Cd exposure (by terminating homegrown vegetable consumption) and Pb exposure (by reducing dust emissions and soil particle contact for children).

Table 5 Total concentrations of Cd in soils (mean and range of Cd concentrations), total hazard quotient (THO) obtained by the HO-based risk assessment method, and the resultant sitespecific assessment criteria (SSAC) generated by the SNIFFER model for the 34 kitchen garden soils

	Average soil	Range of Cd concentrations		Adults	5	Children		
	Cd concentration mg kg ⁻¹	Min mg kg ⁻¹	Max mg kg ⁻¹	THQ	SSAC mg kg ⁻¹	THQ	SSAC mg kg ⁻¹	
KG-1	7.1	6.4	7.3	0.05	80.3	0.27	10.3	
KG-2	8.9	8.2	9.0	0.15	43.9	0.59	5.8	
KG-3	6.3	5.8	7.2	0.12	43.3	0.42	6.6	
KG-4	5.1	3.8	5.8	0.08	43.3	0.31	5.7	
KG-5	6.1	5.2	7.5	0.11	34.4	0.52	4.7	
KG-6	3.8	3.6	4.0	0.05	50.1	0.25	6.5	
KG-7	12.6	11.2	14.3	0.05	62.8	0.58	8.4	
KG-8	7.7	5.8	7.9	0.09	56.9	0.41	7.6	
KG-9	7.7	6.4	7.2	0.15	33.6	0.61	4.8	
KG-10	7.7	7.3	8.6	0.16	38.7	0.64	5.2	
KG-11	14.7	14.1	16.1	0.21	54.9	0.82	7.6	
KG-12	10.3	7.0	11.7	0.11	64.4	0.43	8.5	
KG-13	12.6	12.0	14.4	0.09	112.7	0.41	13.6	
KG-14	4.3	3.6	4.7	0.07	51.9	0.27	6.8	
KG-15	2.8	2.8	3.3	0.08	27.4	0.31	3.8	
KG-16	7.3	5.3	8.6	0.02	60.0	0.38	7.7	
KG-17	12.7	10.5	16.9	0.16	65.1	0.77	8.3	
KG-18	10.5	7.4	10.8	0.18	35.8	0.72	4.9	
KG-19	21.1	15.7	23.1	0.18	89.7	0.75	11.7	
KG-20	19.3	18.5	20.6	0.20	74.5	0.81	10.0	
KG-21	10.6	11.3	15.0	0.13	78.4	0.53	10.4	
KG-22	3.9	3.5	4.4	0.11	28.6	0.41	4.1	
KG-23	7.5	5.1	7.7	0.06	85.1	0.25	11.1	
KG-24	4.6	4.2	5.7	0.07	56.3	0.29	7.5	
KG-25	7.5	6.3	9.8	0.09	67.6	0.39	9.0	
KG-26	6.5	6.7	8.1	0.02	51.1	0.40	6.8	
KG-27	5.7	5.2	5.8	0.02	49.3	0.35	6.5	
KG-28	4.4	2.4	4.9	0.10	27.1	0.40	3.8	
KG-29	4.6	4.2	4.9	0.13	27.2	0.51	3.7	
KG-30	6.8	6.7	7.9	0.08	71.7	0.33	9.1	
KG-31	6.4	5.9	8.8	0.06	77.0	0.31	9.9	
KG-32	8.4	8.6	12.7	0.17	42.5	0.69	6.3	
KG-33	4.8	4.5	5.0	0.05	66.3	0.24	8.1	
KG-34	10.8	9.4	12.8	0.17	49.0	0.78	6.2	

Soil total Cd>SSAC in bold

Conclusions

This study has proposed an approach that integrates different methods for human health risk assessment that reflect only the potential noncarcinogenic risk for Cd and Pb. Cadmium is also a carcinogen, but cancer risk was not determined due to lack of information for oral exposure. This study focuses on the estimation of the potential level of human health risks associated with chronic exposure to Cd and Pb in 34 kitchen garden soils through ingestion of soil particles and consumption of homegrown vegetables. Using the HQ-based risk assessment method, the results suggest that the two exposure pathways considered should not engender any form of deleterious health effects for adults living in the vicinity of the former smelter. For children, the Pb levels in the soils studied were the cause of a relatively high health risk, in particular, through soil particle ingestion. For Cd, the approach consisted in deriving site-specific assessment criteria for each kitchen garden using the SNIFFER method and then calculating the HQs. The results showed that most of the total Cd concentrations in soils exceeded the derived SSAC, in particular, through consumption of homegrown vegetables, even if the THQ values were less than 1.0. For Cd, the SSAC offers an efficient but more cautious approach than the HQ-based risk assessment method. However, risk assessment for combined Cd and Pb suggested that children are subjected to a potential health risk. Consequently, garden management actions are necessary in order to reduce risk exposure, even if further investigations will specify some aspects of risk assessment, such as the consideration of metal bioaccessibility in vegetables or the effects of cooking on the metal concentrations in homegrown vegetables. Moreover, the full integration method has only been carried out on Cd, and more elements need to be studied to show of the methodology is robust.

Acknowledgments The authors wish to thank the gardeners who participated in the investigations. The study was supported by a grant from the Région Nord-Pas de Calais.

References

- Alloway, B. J. (2004). Contamination of soils in domestic gardens and allotments; a brief overview. *Land Contamination* & *Reclamation*, 12, 179–187.
- Bellinger, D. C., & Needleman, H. L. (2003). Intellectual impairment and blood lead levels. *The New England Journal* of Medicine, 349, 500–501.
- Bertrand, M. (1993). Consommation et lieux d'achat des produits alimentaires en 1991, INSEE Résultats, 262-263, Collection Consommation et modes de vie, 54-55. Paris: Editions INSEE.
- Brandon, E. F., Oomen, A. G., Rompelberg, C. J., Versantvoort, C. H., van Engelen, J. G., & Sips, A. J. (2006). Consumer product in vitro digestion model: Bioaccessibility of contaminants and its application in risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 44, 161–171.
- Cambra, K., Martinez, T., Uzurlai, A., & Alonso, E. (1999). Risk analysis of a farm area near lead- and cadmium-

contaminated industrial site. *Journal of Soil Contamination*, 8, 527–540.

- Canfield, R. L., Henderson, C. R., Cory-Schlecta, D. A., Cox, C., Jusko, T. A., & Lanphear, B. P. (2003). Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 µg per deciliter. *The New England Journal of Medicine*, 348, 1517–1526.
- Cheng, Y., & Nathanail, P. C. (2009). Generic assessment criteria for human health risk assessment of potentially contaminated land in China. *The Science of the Total Environment*, 408, 324–339.
- De Saint Paul, T. (2006). Corps et appartenance sociale: La corpulence en Europe. La société française: Données sociales.
- Denys, S., Caboche, J., Tack, K., & Delalain, P. (2007). Bioaccessibility of lead in high carbonate soils. *Journal of Environmental Science and Health A*, 42, 1331–1339.
- DGAL, (2000). Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, Revue Notre alimentation, n°24, Janvier 2000.
- Douay, F., Roussel, H., Pruvot, C., Loriette, A., & Fourrier, H. (2008). Assessment of a remediation technique using the replacement of contaminated soils in kitchen gardens nearby a former lead smelter in Northern France. *The Science of the Total Environment*, 401, 29–38.
- Douay, F., Pelfrêne, A., Planque, J., Fourrier, H., Richard, A., Roussel, H., & Girondelot, B. (2012) Assessment of potential health risk for inhabitants living near a former lead smelter. Part 1: Metal concentrations in soils, agricultural crops, and homegrown vegetables. Environmental Monitoring and Assessment (in press).
- Earl, N., Macklin, Y. & Abedo, T. (2005). Using science to create a better place CLEA UK Handbook support document for the CLEA UK software beta version 1.0. Bristol, Environment Agency, withdrawn.
- 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.
- Ferguson, C. (1996). Assessing human health risks from exposure to contaminated land. Land Contamination & Reclamation, 4, 159–170.
- Ferguson, C., Darmendrail, D., Freier, K., Jensen, B. K., Jensen, J., Kasamas, H., et al. (1998). *Risk assessment for contaminated sites in Europe*. Nottingham: LQM Press.
- Ferguson, C., Nathanail, P., McCaffrey, C., Earl, N., Foster, N. D., Gillet, A. G., et al. (2003). *Method for deriving site-specific human health assessment criteria for contaminants in soil. SNIFFER-Report, No. LQ01.* Marlow: Foundation of Water Research (FWR).
- Fryer, M.E., Collins, C.D., Colvile, R.N., Ferrier, H., & Nieuwenhuijsen, M.J. (2004). Evaluation of currently used exposure models to define a human exposure model for use in chemical risk assessment in the UK. The Interdepartmental Group on Health Risks from Chemicals.
- Grasmuck, D., & Scholz, R. W. (2005). Risk perception of heavy metal soil contamination by high-exposed and lowexposed inhabitants: The role of knowledge and emotional concerns. *Risk Analysis*, 25, 611–622.
- Hough, R. L., Breward, N., Young, S. D., Crout, N. M. J., Tye, A. M., Moir, A. M., et al. (2004). Assessing potential risk

Environ Monit Assess (2013) 185:2999-3012

of heavy metal exposure from consumption of homeproduced vegetables by urban populations. *Environmental Health Perspectives*, *112*, 215–221.

- Jarup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. British Medical Bulletin, 68, 167–182.
- JECFA, (1993). Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants. Geneva, Joint FAO/WHO expert committed on food additives, WHO Technical Report Series, No.837.
- JECFA, (2010). Joint FAO/WHO expert committed on food additives. Seventy-third meeting, Genova, 8–17 June 2010, Summary and Conclusions.
- Kordas, K., Canfield, R. L., López, P., Rosado, J. L., Vargas, G. G., Cebrián, M. E., et al. (2006). Deficits in cognitive function and achievement in Mexican first-graders with low blood lead concentrations. *Environmental Research*, 100, 371–386.
- Lanphear, B. P., Hornung, R., Khoury, J., Yolton, K., Baghurst, P., Bellinger, D. C., et al. (2005). Low-level environmental lead exposure and children's intellectual function: An international pooled analysis. *Environmental Health Per*spectives, 113, 894–899.
- Luo, X. S., Yu, S., Zhu, Y. G., & Li, X. D. (2011). Trace metal contamination in urban soils of China. *The Science of the Total Environment*. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.04.020.
- Man, Y. B., Sun, X. L., Zhao, Y. G., Lopez, B. N., Chung, S. S., Wu, S. C., et al. (2010). Health risk assessment of abandoned agricultural soils based on heavy metal contents in Hong Kong, the world's most populated city. *Environment International*, 36, 570–576.
- Millis, P. R., Ramsey, M. H., & John, E. A. (2004). Heterogeneity of cadmium concentration in soil as a source of uncertainty in plant uptake and its implications for human health risk assessment. *The Science of the Total Environment*, 326, 49–53.
- Nathanail, C. P. (2006). Generic and site-specific criteria in assessment of human health risk from contaminated soil. *Soil Use and Management*, 21, 500–507.
- Nathanail, P., McCaffrey, C., Earl, N., Foster, N., Gillett, A., & Ogden, R. (2005). A deterministic method for deriving site-specific human health assessment criteria for contaminants in soil. *Human and Ecological Risk Assessment*, 11, 389–410.
- Oliver, M. A. (1997). Soil and human health: A review. *European Journal of Soil Science*, 48, 573–592.
- 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.
- Poggio, L., Vrščaj, B., Hepperle, E., Schulin, R., & Marsan, F. A. (2008). Introducing a method of human health risk evaluation for planning and soil quality management of heavy metal-polluted soils—An example from Grugliasco (Italy). *Lanscape and Urban Planning*, 88, 64–72.

- Reilly, C. (1991). Metal contamination of food (2nd ed.). London: Elsevier Applied Science.
- 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.
- Sánchez-Camazano, M., Sánchez-Martin, M. J., & Lorenzo, L. F. (1994). Lead and cadmium in soils and vegetables from urban gardens of Salamanca (Spain). *The Science of the Total Environment*, 146(147), 163–168.
- Scholz, R. W., & Schnabel, U. (2006). Decision making under uncertainty in case of soil remediation. *Journal of Envi*ronmental Management, 80, 132–147.
- Sterckeman, T., Douay, F., Proix, N., & Fourrier, H. (2000). Vertical distribution of Cd, Pb and Zn in soils near smelters in the North of France. *Environmental Pollution*, 107, 377–389.
- Sterckeman, T., Douay, F., Proix, N., Fourrier, H., & Perdrix, E. (2002). Assessment of the contamination of cultivated soils by eighteen trace elements around smelters in the North of France. *Water, Air, and Soil Pollution, 135*, 173–194.
- Strikwold, M., & Smit, P. J. (2003). Developments in soil contamination decision-making process results in specific human exposure models. The Sixth International Symposium and Exhibition on Environmental Contamination in Central and Eastern Europe and the Commonwealth of Independent States. Prague: Institute for International Cooperative Environmental Research (IICER) of Florida State University.
- Surkan, P. J., Zhang, A., Trachtenberg, F., Daniel, D. B., McKinlay, S., & Bellinger, D. C. (2007). Neuropsychological function in children with blood lead levels <10 microg/ dL. *Neurotoxicology*, 28, 1170–1177.
- Thompson, K. M. (1998). Software Review of Risk*Assistant (Version 1.1) and RiskEZ (Version 1), both for Windows. *Human and Ecological Risk Assessment*, 4, 647–652.
- USEPA, (1998). Integrated risk information system-database, Philadelphia PA; Washington, DC.
- USEPA (2007). Integrated risk information system-database; Philadelphia PA; Washington, DC.
- Wang, Z. X., Chen, J. Q., Chai, L. Y., Yang, Z. H., Huang, S. H., & Zheng, Y. (2011). Environmental impact and sitespecific human health risks of chromium in the vicinity of a ferro-alloy manufactory, China. *Journal of Hazardous Materials*, 190, 980–985.
- Wong, J. W. C. (1996). Heavy metal contents in vegetables and market garden soils in Hong Kong. *Environmental Tech*nology, 17, 407–414.
- Wong, C. S. C., Li, X., & Thornton, I. (2006). Urban environmental geochemistry of trace metals. *Environmental Pollution*, 142, 1–16.
- Wragg, J., Cave, M., Basta, N., Brandon, E., Casteel, S., Denys, S., et al. (2011). An inter-laboratory trial of the unified BARGE bioaccessibility method for arsenic, cadmium and lead in soil. *The Science of the Total Environment*, 409, 4016–4030.

Dans la littérature internationale, les *DJE* calculées en prenant en compte la bioaccessibilité sont ensuite comparées aux *VTR*. La pertinence de cette comparaison a été récemment posée par l'INERIS et l'InVS (Dor et al., 2012). En effet, les VTR ayant été définies pour une matrice de référence (solution ou aliment) servant de vecteur à l'administration du polluant, il est nécessaire, pour le calcul de risque, d'intégrer la biodisponibilité ou bioaccessibilité relative du polluant dans le sol par rapport à celle de ce même polluant dans la matrice de référence. Or, peu de données sont actuellement disponibles concernant ces dernières valeurs. Ceci nécessite donc le recours à des hypothèses pour mener à bien l'intégration de la biodisponibilité ou bioaccessibilité relatives dans le calcul des risques. Aussi, l'intégration des notions de biodisponibilité et bioaccessibilité relatives doit être justifiée et ne peut reposer que sur des hypothèses que l'évaluateur doit clairement expliciter.

L'utilisation de la biodisponibilité orale absolue en évaluation de risque imposerait que les *VTR* soient elles-mêmes construites à partir de doses absorbées (ou internes). Or ce n'est pas toujours le cas, ce qui a pour conséquence que l'utilisation de la notion de biodisponibilité absolue est actuellement impossible. Néanmoins, il est envisageable d'utiliser un facteur de biodisponibilité relative (BD_{rel}), lequel permet de quantifier la différence de biodisponibilité d'une substance entre une matrice « terre » et la matrice de référence (fondant la *VTR*) utilisé pour le calcul de risque :

$$BD_{rel} = \frac{BD_{terre}}{BD_{VTR}} = \frac{BA_{terre} \times fa_{terre}}{BA_{VTR} \times fa_{VTR}}$$

Avec :

 BD_{rel} : facteur de biodisponibilité relative (sans unité) BD_{terre} : biodisponibilité absolue de la substance avec la matrice terre (sans unité) BD_{VTR} : biodisponibilité absolue de la substance avec la matrice de référence (sans unité) BA_{terre} : bioaccessibilité absolue de la substance avec la matrice terre (sans unité) BA_{VTR} : bioaccessibilité absolue de la substance avec la matrice de référence (sans unité) BA_{VTR} : bioaccessibilité absolue de la substance avec la matrice de référence (sans unité) fa_{terre} : fraction absorbée de la substance extraite de la matrice terre (sans unité) fa_{VTR} : fraction absorbée de la substance extraite de la matrice de référence (sans unité)

Le facteur de biodisponibilité relative pourrait donc être utilisé pour le calcul de la dose d'exposition ajustée ($DJE_{ajustée}$) qui correspond à l'exposition interne à la substance contenue dans le sol tenant compte de sa biodisponibilité dans la matrice utilisée pour élaborer la VTR et dans la terre étudiée. Cette $DJE_{ajustée}$ est ainsi directement comparable à la VTR disponible dans la littérature (qui est une dose externe).

$$DJE_{ajust\acute{e}e} = DJE \times BD_{rel} = \frac{DJE \times BD_{terre}}{BD_{VTR}} = DJE \times \frac{BA_{terre} \times fa_{terre}}{BA_{VTR} \times fa_{VTR}}$$

Pour utiliser ce paramètre, il est nécessaire de connaître (1) les biodisponibilités absolues de l'élément dans le sol et la matrice de référence utilisée dans les études toxicologiques de définition de la *VTR* ou (2) en absolu ou relatif, les paramètres de bioaccessibilité et d'absorption de la substance.

Sur la base des résultats obtenus pour Cd par Caboche (2009), Dor et al. (2012) proposent un calcul de BD_{rel} . En effet, il a été montré l'égalité des absorptions pour cet élément qu'il soit issu du sol contaminé ou d'eau de boisson. Il en résulte que la fraction absorbée de la substance extraite de la matrice terre (fa_{terre}) est égale à celle de la substance extraite de la matrice de référence (fa_{VTR}). On a alors l'équation suivante pour Cd :

$$DJE_{ajust\acute{e}e} = DJE \times \frac{BA_{terre}}{BA_{VTR}}$$

Il a également été démontré que la bioaccessibilité absolue en phase G de Cd dans l'eau de boisson est proche de 100% (Caboche, 2009). Ce résultat permet la simplification suivante :

$$DJE_{ajustée} = DJE \times BA_{terre}$$

Ainsi, dans le cas de Cd, la mesure de la bioaccessibilité suffit à ajuster la dose journalière d'exposition.

Une démarche similaire a été conduite sur Pb. Sa *VTR* établie par l'OMS a été calculée en tenant compte de toutes les sources de plomb (eau, air, alimentation) dans l'objectif de ne pas dépasser une plombémie de 50 μ g/L chez l'enfant. Son calcul a été réalisé sur la base : (1) d'une absorption de Pb de 20 à 80% dans l'alimentation chez l'enfant (Ziegler et al., 1978 ; DeMichele, 1984) et (2) d'une rétention de Pb de 30% dans l'organisme. Selon Oomen et al. (2006), la biodisponibilité absolue de Pb dans la matrice de référence peut être estimée à 40% en moyenne. Ainsi, le calcul de dose d'exposition ajustée pour cet élément peut être fait selon l'équation suivante, moyennant les hypothèses concernant la biodisponibilité et l'absorption de Pb. Pour un enfant et en considérant la valeur maximale de l'absorption de 80%, on obtient :

$$DJE_{ajust\acute{e}e} = DJE \times \frac{BA_{terre} \times fa_{terre}}{BA_{VTR} \times fa_{VTR}} = DJE \times \frac{BA_{terre} \times 0.8}{0.4} = DJE \times 2BA_{terre}$$

A l'heure actuelle, la toxicologie et la *VTR* de Pb sont en discussion et révision. L'ANSES propose une *VTR* correspondant à une plombémie totale de 15 μ g/L tant pour l'enfant que pour l'adulte en considérant toutes les voies potentielles d'exposition. La formulation proposée pour le calcul de *DJE*_{aiustée} reste valable et peut être retenue.

L'ensemble des hypothèses et simplifications proposées pour Cd et Pb sont valables uniquement lorsque la bioaccessibilité est issue du test UBM. De plus, dans le cas d'une évaluation des expositions et des risques, l'INERIS prend en compte la valeur de bioaccessibilité la plus élevée des deux phases.

En considérant les travaux de l'INERIS et l'InVS basés sur le test UBM, la mesure de la bioaccessibilité de Cd dans la phase G suffit à ajuster la *DJE*. Les résultats que j'ai obtenus sur les 34 jardins du site atelier restent donc inchangés. Pour Pb, un facteur 2 intervient dans l'ajustement. Aussi, le Tableau III.1 présente la distribution de l'ensemble des résultats (1) avec et sans prise en compte de la bioaccessibilité orale dans la phase gastrique et (2) avec et sans l'ajustement de la dose journalière d'exposition (dans le cas de Pb), et ce, en conservant les mêmes paramètres d'exposition [**11**].

r			0 0	F- 5/ 1						
	Cd				Pb					
	Ε	nfant	Α	dulte		Enfan	ıt		Adult	te
$(\mu g/kg_{pc}/j)$	DJE	DJE (G)	DJE	DJE (G)	DJE	DJE (G)	DJE _{ajustée} (G)	DJE	DJE (G)	DJE ajustée (G)
min	0,025	0,019	0,003	0,002	1,70	1,11	2,21	0,20	0,13	0,27
moyenne	0,074	0,056	0,009	0,007	4,72	3,15	6,31	0,57	0,38	0,76
max	0,189	0,138	0,023	0,017	12,78	9,19	18,37	1,53	1,10	2,20
écart type	0,038	0,027	0,005	0,003	2,84	1,95	3,91	0,34	0,23	0,47
(mg/kg _{pc} /j)										
VTR (USEPA ¹)		0,0	01				en dise	cussion		
VTR (JECFA ²)		-				0,0003	3		0,003	5
	QD	<i>QD</i> (G)	QD	<i>QD</i> (G)	QD	<i>QD</i> (G)		QD	<i>QD</i> (G)	
min	0,03	0,02	0,003	0,002	5,7	3,7		0,06	0,04	
moyenne	0,07	0,06	0,009	0,007	15,7	10,5		0,16	0,11	
max	0,19	0,14	0,023	0,017	42,6	30,6		0,44	0,31	
écart type	0,04	0,03	0,005	0,003	9,5	6,5		0,10	0,07	

Tableau III.1. Doses journalières d'exposition (*DJE* exprimées en μg/kg_{pc}/j) et quotient de danger (*QD* exprimés en mg/kg_{pc}/j) pour Cd et Pb en considérant l'enfant et l'adulte

DJE et QD (G) : dose journalière d'exposition et quotient de danger dans la phase gastrique

¹USEPA, 2007c ²JECFA, 1993 et 2010

JECFA, 1993 et 2010

Pour Cd, les résultats mettent bien en évidence une diminution de la DJE et donc du QD avec l'introduction de la bioaccessibilité. Pour Pb, la même observation est faite avec les calculs sans ajustement. Par contre, en considérant la DJE ajustée, les doses calculées ainsi que les QD se trouvent augmentés. Lorsque les concentrations bioaccessibles sont élevées (comprises entre 48 et 77% dans

cette étude), alors leur intégration dans le calcul de la *DJE* n'est plus pertinente. Ceci s'explique par la présence du facteur 2 dans l'ajustement de la dose d'exposition. A minima, les valeurs de bioaccessibilité doivent être inférieures à 50%.

Bilan : En dépit d'une prise de conscience internationale de l'importance des notions de biodisponibilité/bioaccessibilité, il n'existe pas, à l'heure actuelle, de guide d'utilisation des paramètres à considérer dans la quantification du risque en lien avec l'ingestion de particules de terre. Il est nécessaire d'intégrer la biodisponibilité ou bioaccessibilité relative du polluant dans le sol par rapport à celle du polluant dans la matrice de référence. Or il existe peu de données actuellement disponibles concernant ces dernières valeurs. Aussi, la dose absorbée est par défaut considérée égale à la dose d'exposition. Suite aux travaux de Caboche (2009) et Dor et al. (2012), l'intégration de la bioaccessibilité est possible au moyen d'ajustements et ce, pour Cd, Pb et As, mais ne sont valables qu'avec le test UBM. Dans ces conditions, la bioaccessibilité orale permet une estimation plus réaliste de l'exposition. C'est ce qu'ont également montré mes travaux de recherche.

III.2. Evaluation du risque en lien avec la consommation de légumes autoproduits

Dans l'étude présentée précédemment sur les 34 jardins potagers du site atelier, j'ai évalué le risque pour les populations en lien avec la consommation des 7 légumes autoproduits étudiés sans tenir compte de la fraction bioaccessible des métaux dans cette matrice. Aussi, les calculs de risque prenaient en compte les concentrations totales mesurées dans les légumes [11]. J'ai déterminé la bioaccessibilité orale de Cd, Pb et Zn dans les 7 légumes en considérant l'influence du mode de cuisson [6, 29, 51]. Ces données ont été présentées dans le chapitre II.3.2. Je propose dans cette partie du mémoire d'évaluer le risque, au regard de Cd et Pb, en lien avec la consommation de ces légumes en calculant les *DJE* et les *QD* associés et ce, en intégrant la bioaccessibilité.

Les modes d'administration pris en compte dans l'établissement des *VTR* pour la voie orale est l'eau et les aliments. Aussi, l'intégration de la notion de bioaccessibilité dans les calculs de *DJE* en lien avec la consommation de légumes ne nécessite pas, *a priori*, de passer par une *DJE* ajustée car les matrices étudiées sont comparables.

Ma démarche a consisté à calculer pour les 34 potagers les *DJE* et *QD* pour Cd et Pb avec et sans la prise en compte de la bioaccessibilité. Pour cette voie d'exposition, il s'agit de constituer une assiette type en prenant en compte les différents types de légumes (feuilles, fruits, racines, tubercules...). Ceci conduit à proposer pour Cd et Pb une dose journalière d'exposition théorique calculée comme suit :

$$DJE = \frac{\sum_{i} (C_i \times Q_i \times A_i \times BA_i) \times F \times T}{P \times T_m}$$

Avec :

 C_i : concentration de la substance dans le légume de types racines, feuilles, fruits, tubercules, tiges... (mg/kg poids frais)

 Q_i : quantité journalière de légume ingéré de types racines, feuilles, fruits, tubercules, tiges... (kg/j) A_i : % d'autarcie pour le légume considéré

BA_i : bioaccessibilité de l'élément dans le légume considéré

F: fréquence d'exposition (j/an)

T : durée d'exposition (an)

P: poids corporel de la cible (kg_{pc})

 T_m : période de temps sur laquelle l'exposition est moyennée (an) (pour une substance à effets à seuil $T_m = T$)

Pour les différents paramètres énoncés ci-dessus, les hypothèses émises quant aux scénarios retenus pour le calcul de la *DJE* sont les suivantes :

• Population concernée : adulte et enfant

Pour ces deux cibles, les paramètres d'exposition choisis sont basés sur les données classiquement utilisées par l'INERIS, à savoir :

- \Rightarrow Durée de vie et poids : adulte (70 ans et 70 kg) et enfant (6 ans et 15 kg)
- ⇒ Durée d'exposition : 30 ans pour l'adulte et 6 ans pour l'enfant
- \Rightarrow Fréquence d'exposition : 365 j/an (conditions pour des scénarios majorants)

• Productions légumières :

- ⇒ Ont été considérés les 7 légumes étudiés [13] : pomme de terre, carotte, radis, laitue, haricot vert, tomate et poireau. Au global, ces 7 légumes représentent 91% de la part des légumes consommés
- ⇒ Prise en compte des concentrations en Cd et Pb mesurées dans les légumes sélectionnés
- ⇒ Quantités journalières de légumes ingérées et taux d'autoproduction (Tableau III.2) : données basées sur une étude INSEE de 1991 représentatives des habitudes alimentaires du Nord de la France (Bertrand, 1993), à défaut de données plus récentes

	Quantités ingérées	de légumes (kg PF/j)	Taux d'autarcie (%)
	adulte	enfant	
Pomme de terre	0,190	0,171	10,4
Radis	0,010	0,006	17,3
Carotte	0,022	0,013	30,8
Tomate	0,025	0,015	9,4
Haricot vert	0,007	0,004	63,9
Salade	0,010	0,006	58,3
Poireau	0,013	0,008	33,0

Tableau III.2. Quantités journalières de légumes ingérées pour l'adulte et l'enfant et taux d'autarcie

- Bioaccessibilité orale de Cd et Pb dans les légumes :
 - ⇒ Prise en compte des données dans la phase gastrique (phase plus conservatoire) et dans la phase gastro-intestinale (phase plus réaliste et pertinente d'un point de vue physiologique)

En vue d'évaluer, pour Cd et Pb, le risque spécifique à cette voie d'exposition et en considérant les effets survenant à partir d'un seuil, les résultats sont exprimés sous forme du quotient de danger QD. Ce dernier, ratio entre le niveau d'exposition (DJE) et la valeur toxicologique de référence (VTR), n'exprime pas une probabilité de survenue et est donc plutôt d'ordre qualitatif. A ce jour, il est considéré par convention que les situations susceptibles de déclencher une action de santé publique de surveillance ou de prise en charge médicale des populations sont celles qui présentent un QD supérieur à 1; l'exposition est alors supérieure à la VTR.

Pour les 34 potagers que j'ai étudiés, les valeurs de QD de Cd et Pb obtenues pour l'adulte et l'enfant sont présentées dans la Figure III.1 et ce, en prenant en compte les concentrations totales et les concentrations bioaccessibles (dans les phases G et GI) mesurées dans les 7 légumes. Pour Cd, toutes les valeurs calculées pour l'adulte et l'enfant sont inférieures à 1. Dans le cas de Pb, les QD obtenus sont très faibles pour l'adulte (inférieurs à 0,028), tandis que pour l'enfant, les QD sont beaucoup plus importants et, dans certains potagers, dépassent 1 en considérant les concentrations totales. Quels que soient l'élément et la cible considérés, la prise en compte de la bioaccessibilité entraîne une diminution des QD. Pour l'adulte, le passage du QD calculé à partir des concentrations totales au QD calculé avec les concentrations bioaccessibles (dans la phase GI) est en moyenne : (1) pour Cd, de 0,09 à 0,06 et (2) pour Pb, de 0,015 à 0,008. Pour l'enfant, ce passage est en moyenne : (1) pour Cd, de 0,41 à 0,29 et (2) pour Pb, de 0,83 à 0,42.



Figure III.1. Valeurs de *QD* de Cd et Pb (moyennes et écarts types) calculées pour l'adulte et l'enfant en prenant en compte les concentrations totales et les concentrations bioaccessibles (dans les phases G et GI) mesurées dans les 7 légumes étudiés

L'exposition des adultes, *via* la consommation de légumes autoproduits, étant très faible, je me suis intéressée plus spécifiquement à l'exposition des enfants. La Figure III.2 présente donc pour l'enfant, cible la plus sensible, la répartition des QD de Cd et Pb (exprimés en %) en prenant en compte les concentrations totales et bioaccessibles. Pour cela, j'ai défini plusieurs classes afin de voir plus précisément l'impact de l'intégration de la bioaccessibilité sur l'exposition des enfants en lien avec la consommation de légumes autoproduits. Dans le cas de Cd, les résultats mettent en évidence : (1) une majorité de potagers pour lesquels les QD sont compris entre 0,6 et 0,7 (21%), entre 0,3 et 0,4 (26%) et entre 0,2 et 0,3 (24%) et ce, en considérant les concentrations totales ; (2) une diminution du pourcentage de potagers avec des QD compris entre 0,6 et 0,7 (6%) et une augmentation pour les QD compris entre 0,2 et 0,3 (35%) et ce, en intégrant la bioaccessibilité dans la phase G ; et (3) en prenant en compte la bioaccessibilité dans la phase G ; et (3) en prenant en compte la bioaccessibilité dans la phase G is pour centages sont les plus élevées dans les classes 0,1-0,2 (24%) et 0,2-0,3 (38%) (Figure III.2).

Dans le cas de Pb, les résultats mettent en évidence (Figure III.2) : (1) une majorité de potagers pour lesquels les QD sont compris entre 0,5 et 0,75 (41%) avec des pourcentages non négligeables de potagers dans les classes de QD 0,75-1,0 (21%), 1,0-1,25 (15%) et 1,25-1,5 (15%), en considérant les

concentrations totales ; (2) une augmentation des pourcentages de potagers dans la classe de QD 0,25-0,50 (50%) et une diminution dans les classes supérieures à 1,0 en intégrant la bioaccessibilité dans la phase G ; (3) des QD inférieures à 1,0 en prenant en compte la bioaccessibilité dans la phase GI avec une répartition de la majorité des potagers dans les classes 0,25-0,50 et 0,50-0,75.



Figure III.2. Répartition des valeurs de *QD* de Cd et Pb pour l'enfant en prenant en compte les concentrations totales et les concentrations bioaccessibles (dans les phases G et GI) mesurées dans les 7 légumes étudiés

Bilan : L'objectif de mon travail était d'étudier l'intérêt d'introduire la bioaccessibilité dans les calculs de risque en lien avec la consommation de denrées autoproduites. Aussi, les résultats montrent bien que l'exposition des populations concernées via les calculs des doses journalières d'exposition et in fine des quotients de danger se trouvent largement diminués avec l'intégration de la bioaccessibilité, à savoir : (1) une diminution en moyenne pour Cd de 14% et 12% (adulte et enfant, respectivement) avec la bioaccessibilité gastrique ; (2) une diminution en moyenne pour Cd de 31% et 29% (adulte et enfant, respectivement) avec la bioaccessibilité gastro-intestinale ; (3) pour Pb, une diminution de 27% et 30% (adulte et enfant, respectivement) avec la bioaccessibilité gastrique ; et (4) une diminution pour Pb de 47% et 49% (adulte et enfant, respectivement) avec la bioaccessibilité gastro-intestinale.

III.3. Incertitudes dans les évaluations du risque

Pour rendre signifiant les résultats obtenus lors des calculs de risque, il faut tenir compte de la manière dont ils ont été obtenus. Ils ne peuvent être correctement interprétés que si les incertitudes sont discutées. Ces dernières sont multiples et peuvent être liées notamment aux hypothèses retenues, aux données utilisées, aux usages des milieux, aux scénarios d'exposition, aux modèles utilisés et aux valeurs des paramètres dans les modèles (Dong et al., 2015). L'évaluation des incertitudes permet de mettre en perspective les résultats obtenus, de recenser ce qui est connu et ce qui reste incertain et de déterminer l'impact sur le résultat. Deux types d'incertitude scientifique sont exposés dans la littérature :

• l'incertitude dite irréductible (ou variabilité) : elle reflète l'hétérogénéité temporelle, spatiale et la diversité naturelle. Les sources de variabilité sont le résultat de processus

aléatoires naturels, du style de vie et de la susceptibilité génétique des individus dans une population. Il s'agit par exemple des caractéristiques physiologiques qui varient d'un individu à l'autre (poids corporel, taille...), la variabilité de la fréquence et de la durée d'exposition, etc. Cette incertitude peut être réduite en collectant davantage de données ;

• l'incertitude dite réductible ou ignorance : elle reflète le manque total ou partiel de connaissance du phénomène étudié. Ces variables peuvent être des quantités empiriques comme par exemple, la moyenne de la concentration d'un polluant donnée ou le percentile 95 de l'ingestion de terre chez les enfants de moins de 6 ans. Cette incertitude peut être réduite en collectant davantage de données et en améliorant la spécificité, la sensibilité, la fidélité et la reproductibilité de la mesure.

Dans une approche qualitative, l'objectif est d'étudier l'influence des incertitudes, à savoir notamment si les choix faits dans les évaluations tendront à majorer ou minorer l'estimation du risque. Par principe de prudence, ceux-ci doivent plutôt être majorants.

Dans mes travaux de recherche, j'ai mené les calculs de risque par une approche déterministe (au contraire d'une approche probabiliste). Cette approche consiste à faire le choix d'une valeur unique ou d'un encadrement d'une estimation par deux valeurs et de construire un ou plusieurs scénarios d'exposition. Dans ce cas, il peut être retenu un ou plusieurs descripteurs statistiques (moyenne, médiane ou percentile). Cette approche ne permet pas en tant que telle de quantifier l'incertitude autour des estimations. Néanmoins, faire varier les paramètres de l'évaluation permet de déterminer l'influence des incertitudes sur le résultat final. C'est ce que je propose de montrer ici au travers de la voie d'exposition ingestion de particules de terre et de poussières. Parmi les paramètres entrant dans le calcul de la *DJE*, deux d'entre eux font l'objet d'une attention particulière compte tenu de leur incertitude. Il s'agit de la quantité de terre et poussières ingérée et de la fraction biodisponible du polluant.

La quantité de terre et poussières ingérée quotidiennement est une variable d'exposition qui fait débat depuis de nombreuses années. Les discussions portent notamment sur la prise en compte des poussières ou non, de la robustesse des méthodes et des données générées et des facteurs influençant les résultats. Dans les études sanitaires françaises, la valeur choisie pour les enfants âgés de 0 à 6 ans est en général de 100 mg/j, parfois 150 mg/j ; d'autres valeurs plus faibles ou plus élevées peuvent cependant être prises en compte (de 20 à 200 mg/j). Dans mes travaux de recherche (cf § III.2.1 ; [11]), j'ai considéré une quantité ingérée de 100 mg/j. Les données de cette étude ont été reprises en faisant varier ce paramètre afin d'étudier son influence sur la DJE et donc sur l'évaluation du risque. Le Tableau III.3 présente les résultats pour Pb en considérant une bioaccessibilité de 100% par défaut.

fors a define de jeux en exterieur (100 j/un) sur 5 pourgers etudies [11]							
	Quantité de terre ingérée (mg/j)						
		50	100	150	200		
	Potager 1	0,20	0,.39	0,59	0,78		
DIE	Potager 2	0,42	0,85	1,27	1,70		
$(\mu g/kg_{pc}/j)$	Potager 3	0,19	0,38	0,57	0,76		
	Potager 4	0,70	1,40	2,00	2,70		
	Potager 5	1,30	2,60	3,90	5,20		
	Potager 1	0,7	1,3	2,0	2,6		
	Potager 2	1,4	2,8	4,2	5,7		
QD	Potager 3	0,6	1,3	1,9	2,5		
	Potager 4	2,3	4,5	6,8	9,0		
	Potager 5	4,3	8,7	13,0	17,4		

Tableau III.3. Influence de la quantité de terre ingérée sur le calcul de la dose journalière d'exposition (*DJE*) et le quotient de danger (*QD*) pour Pb en considérant l'ingestion de terre pour un enfant âgé de 0 à 6 ans (15 kg) lors d'activité de jeux en extérieur (100 j/an) sur 5 potagers étudiés [**11**]

Les résultats mettent en évidence que cette variable d'exposition a effectivement une forte influence sur la *DJE* et donc sur l'estimation du risque. En faisant varier la quantité ingérée de 50 à 200 mg/j, la *DJE* est multipliée par 4. Suivant la valeur considérée, le quotient de danger obtenu n'aura pas la même signification. D'après le guide IEM¹ (MEDD, 2007), la quantification des risques est interprétée selon les critères suivants :

- si QD < 0,2 : l'état des milieux est compatible avec les usages ;
- si 0,2 < QD < 5 : milieu vulnérable, zone d'incertitude nécessitant une réflexion plus approfondie ;
- si QD > 5 : l'état des milieux n'est pas compatible avec les usages.

Ainsi, pour le potager 4 par exemple, l'interprétation est différente selon que l'on considère $Q \le 100$ mg/j ou $Q \ge 150$ mg/j (Tableau III.3).

Concernant la fraction biodisponible du polluant, ce paramètre n'est pas véritablement considéré à l'heure actuelle et est posé par défaut comme étant égal à 100%. J'ai montré au travers de la bibliographie et de mes travaux de recherche que pour pallier cette ignorance, de nombreuses études portent sur la quantification de la fraction bioaccessible du polluant. Aussi, de nombreuses incertitudes sont également liées à ce paramètre et des questions se posent notamment sur les méthodes de mesures ou d'évaluation, les principaux facteurs capables d'influencer les résultats et les éventuelles différences entre les poussières et la terre. Suivant le test *in vitro* mis en œuvre, les résultats de bioaccessibilité pour un polluant dans un même sol peuvent varier dans des proportions parfois importantes. Oomen et al. (2002) ont comparé 5 tests *in vitro* et ont mis en évidence des variations de la bioaccessibilité allant de 7 à 92% pour Cd (Figure III.3).



Figure III.3. Résultats de bioaccessibilité de Cd obtenus sur trois échantillons de sol à partir de 5 tests *in vitro* (SBET, DIN, RIVM, SHIME et TIM) (d'après Oomen et al., 2002)

Suivant le test sélectionné, l'intégration de la bioaccessibilité dans le calcul du risque aura une influence sur l'interprétation. Par exemple, en considérant le sol 3 et en fixant les différents paramètres d'exposition, le quotient de danger varie de 0,04 avec le test SHIME à 0,72 avec le test SBET (Tableau III.4).

¹ Interprétation de l'Etat des Milieux

Paramètres d'exposition	Test in vitro	QD
Enfant de 0 à 6 ans	SBET	0,72
Poids corporel : 15 kg	DIN	0,57
Quantité de terre ingérée : 100 mg/j	RIVM	0,29
Fréquence d'exposition : 365 j/an	SHIME	0,04
VTR (Cd) : $3,6.10^{-4} \text{ mg/kg}_{pc}/\text{j}$	TIM	0,42
Concentration totale en Cd dans le sol 3 : 39 mg/kg		

 Tableau III.4. Exemple de calcul du quotient de danger (QD) pour le sol 3 en prenant en compte les différents tests in vitro

VTR définie par l'EFSA (2009)

Un autre facteur de variabilité lors de l'intégration de la bioaccessibilité dans le calcul de la DJE est le choix de la phase. Est-il préférable de faire un choix conservatoire pour la santé en retenant la valeur de bioaccessibilité la plus élevée des deux phases (phase gastrique pour Cd et Pb) ou directement considérer la phase gastro-intestinale qui est plus pertinente d'un point de vue physiologique ? C'est une question qui fait également débat et qui a un impact sur l'interprétation des données. Rappelons qu'à l'heure actuelle la fraction bioaccessible obtenue à l'issue des expérimentations peut être intégrée telle qu'elle dans l'équation de la dose journalière d'exposition. Ainsi intégrée, elle apporte un facteur correctif au calcul de la dose d'exposition. En revanche, si la matrice est différente de celle de la VTR, la fraction bioaccessible ne peut être intégrée telle qu'elle dans l'équation du risque sanitaire (cf § III.2.1).

Le calcul des expositions et des risques pose aussi question pour la cible enfant. En effet, il existe également des incertitudes sur la construction des *VTR*. Pour les enfants, le risque de survenue d'effet indésirable en lien avec une exposition à Cd est considéré comme faible, dans la mesure où les effets retenus pour établir la *VTR* sont précoces, non spécifiques et sont observés après une exposition de l'ordre de 50 ans (EAT2, 2011).

Bilan : En fonction de la méthode d'estimation de l'exposition utilisée, il peut en résulter des orientations de gestion inadaptées, excessives ou non justifiées comme le déclenchement d'un dépistage ou d'une prise en charge médicale d'une population, une dépollution de site, la restriction ou l'interdiction de fréquentation d'une zone ou encore l'interdiction pour les populations de cultiver et consommer les légumes de leurs jardins potagers.

Il convient de noter également que s'approcher de la réalité physiologique en introduisant les notions de bioaccessibilité ou biodisponibilité dans les évaluations du risque peut engendrer des coûts des études vraisemblablement plus élevés. Ce critère est directement associé à l'objectif visé à savoir, l'obtention d'une valeur sécuritaire ou réaliste. Des approfondissements sont nécessaires d'un point de vue analytique mais aussi méthodologique en vue d'établir un coût associé à l'introduction de ces notions.

CHAPITRE IV

Bilan général et perspectives

Ce mémoire constitue la synthèse des travaux que j'ai réalisés depuis 2008. Ils s'appuient sur du développement analytique en laboratoire et je les ai orientés très rapidement vers une finalité plus appliquée avec pour objectif de contribuer à l'évaluation de l'exposition aux métaux de l'homme. De la disponibilité environnementale des éléments métalliques à leur disponibilité toxicologique, c'est tout naturellement que mes travaux ont intégrés une problématique globale sur la gestion des sols contaminés. Plus spécifiquement, ils ont contribué à : (1) mieux comprendre les notions de biodisponibilité et bioaccessibilité des polluants inorganiques dans les sols, les poussières et les légumes, et (2) évaluer leur apport dans l'estimation des expositions des populations vivant sur des sites pollués, laquelle se fonde encore, trop souvent, sur les concentrations totales en métaux dans les différentes matrices. Ces différents aspects ont été abordés dans le mémoire en se basant sur des illustrations issues de mes travaux qui ont porté plus spécifiquement sur les alentours de l'ancienne fonderie de plomb Metaleurop Nord. Ont été prises en compte les voies d'apport suivantes : l'ingestion de particules de terre et de poussières, la consommation de légumes cultivés sur des sols de potagers contaminés et l'inhalation de poussières.

Au bilan, pour chaque matrice considérée sur le secteur étudié, j'ai mis en évidence :

Sur les particules de terre :

- une bioaccessibilité des métaux plus importante dans la phase gastrique que dans la phase gastro-intestinale ;
- quel que soit l'usage du sol, $Cd_{bioaccessible} > Pb_{bioaccessible} > Zn_{bioaccessible}$ dans les deux phases, avec en moyenne respectivement une bioaccessibilité de 76%, 59% et 35% dans la phase gastrique et de 43%, 22% et 10% dans la phase gastro-intestinale ;
- une bioaccessibilité orale de Cd, Pb et Zn qui dépend de la spéciation des métaux, des paramètres physico-chimiques des sols et de leurs concentrations totales.

Sur les légumes cultivés dans les jardins (i.e. radis, laitue, haricot vert, poireau, tomate, pomme de terre, carotte) :

- une forte quantité de Cd et Zn des légumes crus solubilisée pendant le processus de digestion (en moyenne respectivement 85% et 87% dans la phase gastrique et 69% et 79% dans la phase gastro-intestinale); des concentrations bioaccessibles pour Pb qui varient selon le légume considéré (entre 54% et 82% dans la phase gastrique et entre 43% et 79% dans la phase gastro-intestinale);
- une bioaccessibilité de Cd, Pb et Zn fortement dépendante des concentrations totales mesurées dans les légumes ;
- une influence du mode de cuisson (vapeur et friture) sur la bioaccessibilité des métaux.

Sur les poussières :

- une bioaccessibilité orale plus faible dans les poussières que dans les sols avec en moyenne 36% et 40% respectivement pour Cd et Pb dans la phase gastrique et 15% et 11% respectivement pour Cd et Pb dans la phase gastro-intestinale ;
- une forte solubilité en moyenne de Cd et Pb dans le fluide pulmonaire considéré (ALF) (74% pour Cd et 69% pour Pb) avec une grande variabilité sur le secteur étudié (de 50 à 100% pour Cd et de 45 à 92% pour Pb) et les concentrations totales des métaux qui sont les paramètres majeurs expliquant la bioaccessibilité pulmonaire des polluants.

Pour la voie orale, les résultats de mon travail mettent en lumière que le test *in vitro* UBM précise les niveaux d'exposition aux métaux des populations en lien avec l'ingestion de particules de terre, de poussières et de légumes. L'intégration de ce paramètre dans l'évaluation sanitaire permet de tenir compte qu'en réalité seule une fraction de la dose ingérée, variable selon l'élément et la matrice, atteint la circulation sanguine. De plus, les résultats obtenus avec le test UBM doivent être adaptés à l'objectif qu'on leur assigne : une valeur sécuritaire ou une valeur réaliste. Le choix de la phase gastrique apparaît pour les métaux étudiés plus souvent sécuritaire. Le choix de mimer les deux phases

a l'avantage de présenter les résultats dans sa globalité, l'évaluation des risques pouvant alors être menée sur un plan plus large et plus réaliste.

Pour la voie inhalation, les premiers essais que j'ai réalisés montre l'intérêt de prendre en compte cette voie pour évaluer l'exposition des populations à Cd et Pb. D'autres expérimentations sont nécessaires, notamment pour démontrer que les mesures chimiques de bioaccessibilité prédisent raisonnablement la biodisponibilité des contaminants (corrélation robuste *in vivo/in vitro*).

Ce travail est également le fruit d'un partenariat sur les tests *in vitro* de bioaccessibilité orale et pulmonaire avec le groupe BARGE, lequel a pesé sur les recherches du laboratoire en les orientant sur ce volet sanitaire. Mes premiers travaux ont longuement porté sur la matrice sol et progressivement, l'expérience acquise a été étendue à d'autres matrices (poussières et végétaux).

Parmi les travaux présentés, certains sont en cours et les résultats restent à valoriser. Les prolongements envisagés pour ces recherches ont été présentés au fil des différents chapitres. Le présent chapitre dessine les grandes lignes des axes de recherche que je souhaite développer au sein du LGCgE-ISA Lille et qui répondent à un même objectif : contribuer à une meilleure évaluation des expositions et des risques sanitaires liés aux polluants. Ces trois axes sont les suivants :

- Axe 1 : Vers l'estimation de la bioaccessibilité orale (1) d'autres polluants ; (2) dans d'autres matrices ;
- Axe 2 : Vers l'intégration de la notion de bioaccessibilité par les gestionnaires de sites et sols pollués dans les études sanitaires ;
- Axe 3 : Vers la gestion des sites et sols pollués : utilisation des approches de la sociologie de l'environnement et des risques.

Axe 1 : Vers l'estimation de la bioaccessibilité orale (1) d'autres polluants ; (2) dans d'autres matrices

(1) Dans la littérature, les recherches sur les notions de biodisponibilité/bioaccessibilité ont principalement été conduites pour les composés inorganiques, en particulier Pb, Cd et As. Au regard de l'industrialisation et de l'urbanisation, la problématique des sols multicontaminés aux polluants métalliques mais aussi organiques fait de plus en plus l'objet de travaux de recherche à l'échelle nationale et internationale. Pour les polluants organiques, les tests *in vitro* sont nettement moins nombreux que pour les polluants métalliques, très peu sont validés au regard d'expérimentations *in vivo* et encore peu utilisés dans le cadre des évaluations de risques. Il s'agit essentiellement de tests initialement développés pour les polluants métalliques qui ont ensuite été adaptés aux polluants organiques, à savoir : FOREhST (Fed Organic Estimation human Simulation Test), PBET (Physiologically Based Extraction Test) ou SHIME (Simulator of human microbial ecosystem of infants). Parmi les polluants organiques les plus étudiés se trouvent les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Il semble donc nécessaire d'approfondir les connaissances sur ces tests. Dans ce sens, le groupe BARGE a entrepris récemment des expérimentations en vue d'utiliser le test FOREhST pour évaluer la bioaccessibilité orale des polluants organiques dans les sols.

Pour répondre à la problématique de la gestion des sites multicontaminés, mon projet est d'acquérir des compétences sur le test FOREhST, outil prévu pour être utilisé dans le cadre de la thèse d'Adeline Janus que je co-encadre. Pour replacer les choses dans leur contexte, la thèse a pour objectif d'étudier l'intérêt d'un amendement minéral (le biochar ou charbon végétal de miscanthus) pour réduire les dangers environnementaux et sanitaires des sols multicontaminés de friches industrielles (HAP et métaux). Plus spécifiquement, le premier volet de la thèse consiste à optimiser les conditions de production et d'utilisation de l'amendement au regard notamment de ses paramètres physico-chimiques (rendement, surface spécifique, conductivité électrique, porosité, pH, capacité d'échange cationique, teneurs en éléments métalliques et organiques...). Le second volet consiste à mettre en place des expérimentations et des cultures en milieu semi-contrôlé. Sont considérés : (1) des sols contaminés artificiellement avec des HAP et des mélanges HAP - métaux sélectionnés pour être

représentatifs de sols de friches industrielles de la métropole lilloise et des dangers qu'ils présentent ; (2) des sols multi-contaminés (HAP, métaux) de friches. Ces sols feront l'objet d'amendements.

Les questionnements auxquels souhaitent répondre la thèse seront :

- quel sont les effets de l'amendement sur les paramètres physico-chimiques et agronomiques des sols ? Avec quelle pérennité ?
- quels sont les effets d'une rhizosphère sur le comportement des polluants et la dégradation des HAP ?
- quelles sont les interactions entre l'amendement et les polluants selon le degré de contamination des sols (HAP / métaux) ?
- quels sont les effets de ces amendements sur les dangers environnementaux et sanitaires ?

Ma contribution dans ce travail sera donc sur la partie sanitaire en évaluant la bioaccessibilité orale des HAP au moyen du test FOREhST. Ce dernier est basé essentiellement sur le test UBM avec quelques modifications du protocole, notamment l'ajout de nourriture.

(2) La requalification des espaces dégradés tels que les friches industrielles est un enjeu majeur en termes de gestion et sites pollués. Dans le cadre du renouvellement urbain, il s'agit d'une part, de limiter l'expansion des zones urbaines au détriment des espaces agricoles périurbains et d'autre part, d'assurer un développement qui s'inscrit dans le concept de « ville durable ». Parmi les méthodes de requalification des sols pollués, le phytomanagement est adapté à de vastes surfaces et peut aussi constituer une solution transitoire sur des espaces à forte pression foncière. En milieu urbain, une des difficultés réside dans la qualité agronomique médiocre des sols et leur contamination. L'apport de terre est donc souvent une nécessité pour permettre l'installation d'un couvert végétal. Or, cette ressource naturelle devient rare et des solutions alternatives sont à trouver. Parmi les matériaux disponibles, les sédiments fluviaux pourraient présenter un intérêt pour l'élaboration de néosols. Au regard des volumes de sédiments concernés, des impacts environnementaux et des coûts engendrés lors de leur mise en centre de stockage, l'identification de filières de valorisation de ces matériaux s'avère être une nécessité.

C'est dans ce contexte que s'inscrit une de mes perspectives de recherche qui fait l'objet d'une demande de financement de thèse que j'encadrerai en partenariat avec les Mines de Douai. L'objectif est d'évaluer l'exposition des populations aux polluants dans des néosols issus de sédiments de curage. Il s'agira par une approche de laboratoire d'étudier le comportement des polluants et son évolution temporelle dans des sédiments de curage (amendés ou non) d'âges différents. Plus spécifiquement, seront étudiées : (1) la disponibilité environnementale des polluants au moyen de techniques physiques et chimiques, et (2) la bioaccessibilité orale des polluants en lien avec l'ingestion de particules de néosols. Il est à penser que le vieillissement de ces matériaux influe fortement sur la spéciation des polluants et donc, sur les dangers environnementaux et sanitaires. Les expérimentations concerneront des sites de stockage de sédiments réalisés à différentes périodes ainsi que des matériaux fraîchement curés qui subiront en milieu contrôlé un vieillissement accéléré.

Ainsi, les compétences que j'ai acquises que la matrice Sol seront adaptées et transférées aux sédiments depuis leur curage, leur mise en dépôt jusqu'à leur colonisation par une végétation pionnière ou installée.

Axe 2 : Vers l'intégration de la notion de bioaccessibilité par les gestionnaires de sites et sols pollués dans les études sanitaires

Dans la perspective d'une utilisation opérationnelle de la notion de bioaccessibilité dans la gestion des sites et sols pollués, les travaux menés jusqu'à présent ne pourraient suffire. Plusieurs raisons permettent d'expliquer le peu de considération de ce paramètre par les gestionnaires, à savoir :

- le manque de connaissance et la difficulté de compréhension du concept ;
- la diversité et la validité des protocoles ;

• la volonté en France d'avoir une approche systématiquement conservatoire pour évaluer les expositions et les risques en mesurant les concentrations totales des polluants, et qui n'intègre pas les recherches menées autour des concepts de biodisponibilité.

En dépit de travaux réalisés en France pour estimer au moyen du test UBM la bioaccessibilité orale des polluants métalliques sur divers sols pollués, celle-ci n'est pas appliquée par les gestionnaires. Ce constat peut être expliqué pour les raisons suivantes :

- un manque de sensibilisation sur le test UBM et la bioaccessibilité/biodisponibilité, en général ;
- une méconnaissance du test au niveau national, notamment par les maîtres d'ouvrage et les gestionnaires de sites ;
- un test relativement long, coûteux (en comparaison notamment de la détermination des concentrations totales en polluants) et qui nécessite un réel savoir-faire.

Aussi, au regard de ces constats et dans un objectif de meilleure prise en compte de l'exposition des populations, il nous est apparu nécessaire de développer une alternative au test UBM, en proposant une méthode rapide, fiable, moins coûteuse, représentative de la bioaccessibilité orale des polluants métalliques et applicable dans différents contextes environnementaux, c'est-à-dire quels que soient les caractéristiques physico-chimiques du sol, son degré de contamination et l'origine de la pollution. C'est dans cette démarche que je coordonne le projet ODESSA qui a démarré en août 2015 en partenariat avec l'Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique (EHESP) de Rennes. Le projet, qui a été retenu dans le cadre de l'appel à projets GESIPOL 2014 de l'ADEME, repose sur la mise au point et l'évaluation d'une méthode d'extraction chimique ainsi que sur la définition des conditions de son utilisation. Plus spécifiquement, le projet consiste à :

• disposer de sols aux caractéristiques variables en termes de paramètres physico-chimiques (granulométrie, pH, teneurs en carbonates, matières organiques...), historique de contamination, degré de contamination en éléments métalliques mais aussi organiques. L'idée est d'obtenir des échantillons de sol présentant une large gamme de paramètres pouvant influer sur la bioaccessibilité, mais aussi de mieux appréhender, à l'échelle du territoire, l'exposition et les risques liés aux sols multicontaminés. La démarche repose sur une sollicitation de différents réseaux partenaires (SAFIR, ADEME, laboratoires de recherche, bureaux d'étude, laboratoires d'analyses, entreprises);

• améliorer le réalisme de l'exposition humaine en considérant les fractions des sols inférieures à 250 μ m. Dans les études réalisées en France et exposées précédemment, les tests d'extractabilité et de bioaccessibilité ont été réalisés sur la fraction du sol inférieure à 2 mm et broyée pour passer au travers d'un tamis de 250 μ m. Or, comme les polluants sont connus pour être davantage présents sur les fractions fines que grossières, l'exposition évaluée sur la fraction du sol ainsi obtenue peut être largement sous-estimée. Cette analyse n'est de fait pas suffisamment cohérente avec l'exposition ellemême. En effet, la fraction adhérente à la peau et qui entre dans l'exposition par ingestion au travers du contact main bouche correspond à des fractions inférieures, voire très inférieures à 250 μ m. Pour améliorer le réalisme de l'exposition, la démarche porte sur l'évaluation de la bioaccessibilité orale des éléments métalliques présents dans des terres préparées de manière à ne retenir que les fractions inférieures à 250 μ m, c'est-à-dire sans avoir recours à un broyage mécanique des sols. Dans un souci de simplification des procédures de préparation des sols, la démarche proposée intègre aussi une évaluation de la pertinence de travailler sur les fractions inférieures à 250 μ m obtenues par broyage mécanique. Compte tenu des remarques formulées précédemment, cette étape porte sur un nombre limité d'échantillons représentatifs de différents contextes environnementaux ;

• mesurer la bioaccessibilité orale de Cd, Pb et As à partir du test UBM et développer une méthode alternative au test UBM. Cela nécessitera de lever le verrou technique d'une procédure simple, peu coûteuse et reproductible en testant les extractants qui ont fait l'objet de résultats préliminaires dans des conditions variées de paramètres physico-chimiques du sol, d'origine des pollutions, de degré de contamination en éléments métalliques mais aussi organiques.

Pour répondre aux gestionnaires de sites et sols pollués, il s'agit de proposer *in fine* un outil d'aide à la décision mieux adapté à la prise en compte des risques et qui soit applicable dans différents contextes

environnementaux et notamment dans le cas d'une contamination multiple (inorganique et/ou organique). L'objectif final est de proposer une méthode alternative au test UBM qui pourra faire l'objet d'une demande d'accréditation par le comité français d'accréditation (COFRAC) par l'EHESP. De plus, pour assurer la prise en compte de la bioaccessibilité dans la gestion des sites et sols pollués ainsi que l'utilisation d'une méthode simple pour mesurer ce paramètre, leur promotion sera réalisée au travers de colloques, salons ainsi que par la création de supports d'enseignement à distance qui pourront ensuite être repris dans des actions de formation.

Axe 3 : Vers la gestion des sites et sols pollués : utilisation des approches de la sociologie de l'environnement et des risques

La problématique des sites et sols pollués, en particulier la qualité des sols de potagers et des productions légumières, est particulièrement importante dans le nord de la France du fait de son lourd passé industriel, de sa forte densité de population et de la place que représente le jardinage dans les traditions régionales. Une partie de mes travaux de recherche a été menée sur des jardins privatifs et collectifs situés dans différents contextes environnementaux. Il s'agit plus particulièrement des alentours de l'ancienne fonderie Metaleurop Nord [49, 51] mais également de la ville de Lille [25]. Les projets que j'ai menés aux alentours de Metaleurop concernent majoritairement les jardins privatifs et visaient à (1) contribuer à l'évaluation des risques sanitaires liés à l'ingestion de particules de sols contaminés par les métaux et la consommation de légumes autoproduits, et (2) réduire l'exposition des métaux des populations en lien avec le jardinage, les élevages familiaux et la consommation de dentées autoproduites. Ces connaissances sont aujourd'hui destinées à alimenter les réflexions des Services de l'Etat sur la gestion du site, en apportant des arguments scientifiques et techniques sur les quantités produites et consommées, les pratiques culturales des jardiniers, l'aptitude des fruits et des légumes cultivés sur le secteur à accumuler les métaux. Elles sont aussi le support d'une réflexion à mener pour minimiser l'exposition aux métaux des jardiniers et de leur famille en lien avec le jardinage. La démarche intègre des recommandations pratiques pour gérer au mieux ces espaces. Les travaux menés sur la ville de Lille s'inscrivent dans un programme plus vaste qui intègre six autres agglomérations françaises (ANR, projet JASSUR) et qui propose d'éclairer de façon interdisciplinaire les fonctions, les usages, les modes de fonctionnement, les avantages ou les dangers potentiels qu'induisent les jardins associatifs (familiaux et partagés).

Les questions liées à la gestion de ces potagers sont récentes et se posent pleinement aujourd'hui. Une de mes perspectives de recherche est donc de les aborder par un regard pluridisciplinaire en croisant science du sol, géochimie, géographie et sociologie. En utilisant les approches de la sociologie de l'environnement et des risques en lien avec les outils de la démocratie technique, l'idée est d'analyser les nouvelles modalités d'interactions entre experts, gestionnaires et profanes ainsi que les apprentissages résultants de ces échanges croisés. La finalité est bien de contribuer à la réduction de l'exposition aux éléments métalliques des populations via la consommation de légumes et fruits autoproduits et ce, en accompagnant l'ensemble des acteurs concernés (décideurs, gestionnaires, associations, jardiniers et riverains) pour la mise en œuvre d'actions de prévention ou de précaution.

REFERENCES

Abollino O., Giacomino A., Malandrino M., Mentasti E., Aceto M., Barberis R., 2006. Assessment of metal availability in a contaminated soil by sequential extraction. *Water, Air, and Soil Pollution* 173, 315-338.

Abrahams P.W., 2002. Soils: their implications to human health. Science of the Total Environment 291, 1-32.

Adamson I.Y.R., Prieditis H., Hedgecock C., Vincent R., 2000. Zinc is the toxic factor in the lung response to an atmospheric particulate sample. *Toxicology and Applied Pharmacology* 166, 111-119.

Agbenin J.O., Welp G., 2012. Bioavailability of copper, cadmium, zinc and lead in tropical savanna soils assessed by diffusive gradient in thin films (DGT) and ion exchange resin membranes. *Environmental Monitoring and Assessment* 184, 2275-2284.

AFNOR Norme XP ISO/TS 17924, 2008. Qualité du sol - Evaluation de l'exposition humaine par ingestion de sol et de matériaux du sol, mars 2008.

AFNOR PR NF EN ISO 17402, 2011. Qualité du sol – Lignes directrices pour la sélection et l'application des méthodes d'évaluation de la biodisponibilité des contaminants dans le sol et les matériaux du sol, 11 mars 2011.

AFSSA & InVS, 2006. Etude d'imprégnation par les dioxines des populations vivant à proximité d'usines d'incinération d'ordures ménagères. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments et Institut de Veille Sanitaire.

Al Saadi M.M., 2010. Air pollution and respiratory health: an evolving epidemic. *Pakistan Journal of Medical Sciences* 26, 239-243.

Anderson S.D., 1992. Asthma provoked by exercise, hyperventilation, and the inhalation of non-isotonic aerosols. Asthma Basic Mechanisms and Clinical Management, 2nd Ed., Vol 28, Academic Press, New York, pp. 473-490.

Anderson B.J., Rees S.G., Liley A., Stewart A.W., Wardill M.J., 1999. Effect of preoperative paracetamol on gastric volumes and pH in children. *Paediatric Anaesthesia* 9, 203-207.

Ansoborlo E., Chalabreysse J., Escallon S., Hengé-Napoli M.H., 1990. In vitro solubility of uranium tetrafluoride with oxidizing medium compared with in vivo solubility in rats. *International Journal of Radiation Biology* 58, 681-689.

Ansoborlo E., Chalabreysse J., Hengé-Napoli H., Pujol E., 1992. In vitro chemical and cellular tests applied to uranium trioxide with different hydration states. *Environmental Health Perspectives* 97, 139-143.

Antonini J.M., Murthy G.G.K., Rogers R.A., Albert R., Ulrich G.D., Brain J.D., 1996. Pneumotoxicity and pulmonary clearance of different welding fumes after intratracheal instillation in the rat. *Toxicology and Apllied Pharmacology* 140, 188-199.

Arora D., Shah K.A., Halquist M.S., Sakagami M., 2010. In vitro aqueous fluid-capacity-limited dissolution testing of respirable aerosol drug particles generated from inhaler products. *Pharmaceutical Research* 27, 786-795.

ATSDR, 1999. Toxicological profile for cadmium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Department of health and human services, Public Health Service. Atlanta, GA, U.S.

ATSDR, 2005. Toxicological profile for zinc. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Department of health and human services, Public Health Service. Atlanta, GA, U.S.

ATSDR, 2007. Toxicological profile for lead. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Department of health and human services. Public Health Service. Atlanta, GA, U.S.

Bade R., Oh S., Shin W.S., Hwang I., 2013. Human health risk assessment of soils contaminated with metal(loid)s by using DGT uptake: a case study of a former Korean metal refinery site. *Human and Ecological Risk Assessment* 19, 767-777.

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

Baize D., 2001. Evaluer les contaminations diffuses en éléments traces dans les sols. 5^{èmes} Journées GEMAS / COMIFER, Blois, novembre 2001, 281-295.

Barltrop D., Strehlow C.D., Thornton I., Webb J.S., 1975. Absorption of lead from dust and soil. *Postgraduate Medical Journal* 51, 801-804.

Barrett J.E.S., Taylor K.G., Hudson-Edwards K.A., Charnock J.M., 2010. Solid-phase speciation of Pb in urban road dust sediment: a XANES and EXAFS study. *Environmental Science &Technology* 44, 2940-2946.

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

Bastian S., Busch W., Kühnel D., Springer A., Meißner T., Holke R., Scholz S., Iwe M., Pompe W., Gelinsky M., Potthoff A., Richter V., Ikonomidou C., Schirmer K., 2009. Toxicity of tungsten carbide and cobalt-doped tungsten carbide nanoparticles in mammalian cells in vitro. *Environmental Health Perspectives* 117, 530-536.

Bataillard P., 2002. Evolution de la spéciation du plomb et du cadmium dans les sols. Thèse à l'Ecole Nationale du Génie Rural, des Eaux et Forêts.

Bérubé K.A., Jones T.P., Williamson B.J., Winters C., Morgan A.J., Richards R.J., 1999. Physicochemical characterization of diesel exhaust particles: factors for assessing biological activity. *Atmospheric Environment* 33, 1599-1614.

Bertrand M., 1993. Consommation et lieux d'achat des produits alimentaires en 1991, INSEE Résultats, 262-263. Collection Consommation et modes de vie, 54-55, Paris : Editions INSEE.

Borak J., Cohen H., Hethmon T.A., 2000. Copper exposure and metal fume fever: lack of evidence for a causal relationship. *American Industrial Hygiene Association* 61, 832-836.

Bornschein R.L., Succop P., Dietrich K.N., Clarck C.S., Que Hee S., Hammond P.B., 1985. The influence of social and environmental factors on dust lead, hand lead, and blood lead levels in young children. *Environmental Research* 38, 108-118.

Bosscher D., Lu Z., Janssens G., Van Caillie-Bertrand M., Robberescht H., De Rycke H., De Wilde R., Deelstra H., 2001. In vitro availability of zinc from infant foods with increasing phytic acid contents. *British Journal of Nutrition* 86, 241-247.

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

Brain J.D., 1992. Mechanisms, measurement, and significance of lung macrophage function. *Environmental Health Perspectives* 97, 5-10.

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.

Brock T., Stopford W., 2003. Bioaccessibility of metals in human health risk assessment: evaluating risk from exposure to cobalt compounds. *Journal of Environmental Monitoring* 5, 71N-76N.

Brunel C., 2005. Dynamique des éléments traces métalliques (Pb, Zn, Cd) sur un petit bassin versant contaminé par des déchets miniers. Cas du bassin versant amont du Lez. Thèse de doctorat de l'Université de Toulouse III, 276 pp.

Buchet J.P., Lauwerys R.R., Yager J.W., 1995. Lung retention and bioavailability of arsenic after single intratracheal administration of sodium arsenite, sodium arsenate, fly ash and copper smelter dust in the hamster. *Environmental Geochemistry and Health* 17, 182-188.

Buzier R., Tusseau-Vuillemin M.H., Mouchel J.M., 2006a. Evaluation of DGT as a metal speciation tool in wastewater. *Science of the Total Environment* 358, 277-285.

Buzier R., Tusseau-Vuillemin M.H., Martin dit Meriadec C., Rousselot O., Mouchel J.M., 2006b. Trace metal speciation and fluxes within a major French wastewater treatment plant: Impact of the successive treatments stages. *Chemosphere* 65, 2419-2426.

Buzier R., Tusseau-Vuillemin M.H., Keirsbulck M., Mouchel J.M., 2008. Inputs of total and labile trace metals from wasterwater treatment plants effluents to the Seine river. *Physics and Chemistry of the Earth* in press.

Buzier R., Charriau A., Corona D., Lenain J.F., Fondanèche P., Joussein E., Poulier G., Lissalde S., Mazzella N., Guibaud G., 2014. DGT-labile As, Cd, Cu and Ni monitoring in freshwater: toward a framework for interpretation of in situ deployment. *Environmental Pollution* 192, 52-58.

Caboche J., 2009. Validation d'un test de mesure de bioaccessibilité. Application à quatre éléments traces métalliques dans les sols : As, Cd, Pb et Sb. Thèse de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, 348 pp.

Caboche J., Esperenza P., Bruno M., Alleman L.Y., 2011. Development of an in vitro method to estimate lung bioaccessibility of metals from atmospheric particles. *Journal of Environmental Monitoring* 13, 621-630.

Calabrese E.J., Barnes R., Stanek E.J., Pastides H., Gilbert C.E., Veneman P., Wang X., Lasztity A., Kostecki P.T., 1989. How much soil do young children ingest: an epidemiologic study. *Regulatory and Pharmacology* 10, 123-137.

Calabrese E.J., Stanek E.J., 1992. What proportion of household dust is derived from outdoor dust? *Journal of Soil Contamination* 1, 253-263.

Calabrese E.J., Stanek E.J., James R.C., Roberts S.M., 1997. Soil ingestion: a concern for acute toxicity in children. *Environmental Health Perspectives* 105, 1354-1358.

Campbell P.G.C., 1995. In Tessier A., Turner D.R. (Eds). Metal speciation and bioavailability in aquatic systems. IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems, Wiley, Chichester, pp. 45-102.

Caravanos J., Weiss A.L., Blaise M.J., Jaeger R.J., 2006. A survey of spatially distributed exterior dust lead loadings in New York City. *Environmental Research* 100, 165-172.

Carrizales L., Razo I., Téllez-Hernández J.I., Torres-Nerio R., Torres A., Batres L.E., Cubillas A.C., Díaz-Barriga F., 2006. Exposure to arsenic and lead of children living near a copper-smelter in San Luis Potosi, Mexico: Importance of soil contamination for exposure of children. *Environmental Research* 101, 1-10.

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

Cave M., Wragg J., Klinck B., Grøn C., Oomen A., van de Wiele T., Ollson I., Koch K., Reimer N., Basta N., Tack K., Casteel S., 2006. Preliminary assessment of a unified bioaccessibility method for arsenic in soils. International conference in Epidemiology and Environmental Exposure, Paris, 2-6 September 2006.

Chan D., Black B.A., Hale J., 2007. Cadmium bioavailability and bioaccessibility as determined by in vitro digestion, dialysis and intestinal epithelial monolayers, and compared to in vivo data. *Journal of Environmental Science and Health Part A* 42, 1283-1291.

Charman W.N., Porter C.J.H., Mithani S., Dressman J.B., 1997. Physicochemical and physiological mechanisms for the effects of food on drug absorption: the role of lipids and pH. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 86, 269-282.

Charney E., Sayre J., Coulter M., 1980. Increased lead absorption in inner city children: where does lead come from? *Pediatrics* 65, 226-231.

Chauhan V., Breznan D., Goegan P., Nadeau D., Karthikeyan S., Brook J.R., Vincent R., 2004. Effects of ambient air particles on nitric oxide production in macrophage cell lines. *Cell Biology and Toxicology* 20, 221-239.

Clark S., Menrath W., Chen M., Succop P., Bornschein R., Galke W., Wilson J., 2004. The influence of exterior dust and soil lead on interior dust lead levels in housing that had undergone lead-based paint hazard control. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene* 1, 273-282.

Colombo C., Monhemius A.J., Plant J.A., 2008. Platinum, palladium and rhodium release from vehicle exhaust catalysts and road dust exposed to simulated lung fluids. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 722-730.

Commissariat général au développement durable, 2013. Basol : un panorama des sites et sols pollués, ou potentiellement pollués, nécessitant une action des pouvoirs publics. Service de l'observation et des statistiques, Etudes & Documents, n°97, 44 pp.

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

Copley M., Son Y.J., McConville J., 2010. Dissolution testing for inhaled drugs. *Pharmaceutical Technology Europe* 22(11).

Costa D.L., Dreher K.L., 1997. Bioavailable transition metals in particulate matter mediate cardiopulmonary injury in healthy and compromised animal models. *Environmental Health Perspectives* 105, 1053-1060.

Dagher Z., Garçon G., Billet S., Gosset P., Ledoux F., Courcot D., Aboukais A., Shirali P., 2006. Activation of different pathways of apoptosis by air pollution particulate matter (PM 2.5) in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicology* 225, 12-24.

Daugherty A.L., Mrsny R.J., 1999. Transcellular uptake mechanisms of the intestinal epithelial barrier. *Pharmaceutical Science & Technology Today* 2, 144-151.

Davies B.E., Elwood P.C., Gallacher J., Ginnever R.C., 1985. The relationships between heavy metals in garden soils and house dusts in an old lead mining area of north Wales, Great Britain. *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical* 9, 255-266.

Davies N.M., Feddah M.R., 2003. A novel method for assessing dissolution of aerosol inhaler products. *International Journal of Pharmaceutics* 255, 175-187.

Davies D.J.A., Thornton I., Watt J.M., Culbard E.B., Harvey P.G., Delves H.T., Sherlock J.C., Smart G.A., Thomas J.F.A., Quinn M.J., 1990. Lead intake and blood lead in two-year-old UK urban children. *Science of the Total Environment* 90, 13-29.

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

Davis A., Drexler J.W., Ruby M.V., Nicholson A., 1993. Micromineralogy of mine wastes in relation to lead bioavailability. *Environmental Science & Technology* 27, 1415-1425.

Davison W., Zhang H., 1994. In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thinfilm gels. *Nature* 367, 546-548. Davison W., Zhang H., 1995. Performance characteristics of diffusion gradients in thin films for the in situ measurement of trace metals in aqueous solution. *Analytical Chemistry* 67, 3391-3400.

Davranche M., Bollinger J.C., 2000. Release of metals from iron oxyhydroxydes under reductive conditions: Effects of metal/solid interactions. *Journal of Colloid and Interface Science* 232, 165-173.

Declercq C., Beaubois M., 2001. Programme de dépistage du saturnisme autour du site de Metaleurop à Noyelles-Godault – Bilan de la campagne 1999-2000. Observatoire régional de la santé Nord-Pas de Calais et Comité d'hygiène sociale du Pas de Calais, 38 pp.

Declercq C., Ladrière L., 2005. Programme de dépistage du saturnisme infantile dans les 9 communes du Nord et du Pas de Calais – Bilan de la champagne 2004-2005. Observatoire régional de la santé Nord-Pas de Calais et Comité d'hygiène sociale du Pas de Calais, 12 pp.

De Meringo A., Morscheidt C., Thélohan S., Tiesler H., 1994. In vitro assessment of biodurability: Acellular systems. *Environmental Health Perspectives* 102, 47-53.

De Michele S.J., 1984. Nutrition of lead. Comparative Biochemistry and Physiology Part A 78, 401-408.

Denison F., Garnier-Laplace J., 2005. The effects of database parameter uncertainty on uranium(VI) equilibrium calculations. *Geochemica et Cosmochemica Acta* 69, 2183-2191.

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

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.

Des Ligneris L., Douay F., Sterckeman T., 1999. Programme de Recherches Concertées. Environnement et Activités Humaines. Etude d'un secteur pollué par les métaux. 1^{ère} partie : Teneurs en métaux (Pb, Cd et Zn) de végétaux cultivés dans les exploitations agricoles et les jardins familiaux. Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Région Nord – Pas de Calais. FEDER, 130 pp.

Deziel N.C., Rull R.P., Colt J.S., Reynolds P., Whitehead T.P., Gunier R.B., Month S.R., Taggart D.R., Buffler P., Ward M.H., Metayer C., 2014. Polycycil aromatic hydrocarbons in residential dust and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Environmental Research* 133, 388-395.

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.

Dockery D.W., Pope III C.A., 1994. Acute respiratory effects of particulate air pollution. *Annual Review of Public Health* 15, 107-132.

Dong Z., Liu Y., Duan L., Bekele D., Naidu R., 2015. Uncertainties in human health risk assessment of environmental contaminants: A review and perspective. *Environment International* 85, 120-132.

Dor F., Denys S. et les membres du GT, 2012. Quantités de terre et poussières ingérées par un enfant de moins de 6 ans et bioaccessibilité des polluants. Etat des connaissances et propositions. Institut de Veille Sanitaire, 83 pp.

Dos Santos M., Gómez D., Dawidowski L., Gautier E., Smichowski P., 2009. Determination of water-soluble and insoluble compounds in size classified airborne particulate matter. *Microchemical Journal* 91, 133-139.

Douay F., Fourrier H., 2001a. Programme de Recherches Concertées. Environnement et Activités Humaines. Etude d'un secteur pollué par les métaux. Cartographie des teneurs en cadmium, plomb et zinc dans les horizons organo-minéraux des parcelles agricoles autour des sites métallurgiques de Noyelles-Godault et d'Auby, 27 pp.

Douay F., Pruvot C., Sterckeman T., Cieselski H., 2001b. Programme de Recherches Concertées. Environnement et Activités Humaines. Etude d'un secteur pollué par les métaux. Complément sur la connaissance des teneurs en

métaux (Cd, Pb et Zn) de végétaux cultivés dans les exploitations agricoles aux alentours des sites métallurgiques de Noyelles-Godault et d'Auby. Influence des retombées de poussières sur la contamination de cultures potagères, 63 pp.

Douay F., Pruvot C., Mazzuca M., Howsam M., Fourrier H., de Saint Mahieu A.S., Waterlot C., 2005. Cadmium, lead and zinc concentrations in soil and vegetables from kitchen gardens in urban and highly-contaminated areas of northern France: Evaluation of the risk of population exposure. In: Proceedings of the 9th International FZK/TNO Conference on Soil-Water Systems, Bordeaux, France, 667-676.

Douay F., Roussel H., Pruvot C., Loriette A., Fourrier H., 2006. Assessment of a remediation using the replacement of contaminated soils in kitchen gardens from the neighbourhood of a smelter in the Northern France. Difpolmine Conference ADEME, 12-13 Décember 2006, Montpellier.

Douay F., Pruvot C., Roussel H., Cieselski H., Fourrier H., Proix N., Waterlot C., 2008a. Contamination of urban soils in an area of Northern France polluted by dust emissions of two smelters. *Water Air and Soil Pollution* 188, 247-260.

Douay F., Roussel H., Pruvot C., Waterlot C., 2008b. Impact of a smelter closedown on metal contents of wheat cultivated in the neighbourhood. *Environmental Science and Pollution Research* 15, 162-169.

Douay F., Pruvot C., Waterlot C., Fritsch C., Fourrier H., Loriette A., Bidar G., Grand C., de Vaufleury A., Scheifler R., 2009. Contamination of woody habitat soils around a former lead smelter in the North of France. *Science of the Total Environment* 407, 5564-5577.

Douay F., Planque J., Loriette A., Fourrier H., 2011. Site Metaleurop Nord à Noyelles-Godault (62) Campagnes de mesures des teneurs en plomb et en cadmium autour de l'ancien site industriel. Rapport ADEME, 2 tomes, 138 et 1162 pp.

Dressman J.B., Berardi R.R., Dermentzoglou L.C., Russel T.L., Schmaltz S.P., Barnett J.L., Jarvenpaa K.M., 1990. Upper gastrointestinal (GI) pH in young, healthy men and women. *Pharmaceutical Research* 7, 756-761.

DRIRE, 2003. L'industrie au regard de l'environnement. Ministère de l'Economie, des Finances et de l'Industrie.

Drysdale M., Ljung Bjorjlund K., Jamieson H.E., Weinstein P., Cook A., Watkins R.T., 2012. Evaluating the respiratory bioaccessibility of nickel in soil through the use of a simulated lung fluid. *Environmental Geochemistry and Health* 34, 279-288.

Dudka S., Piotrowska M., Chlopecka A., Witek T., 1995. Trace metal contamination of soils, and crop plants by mining and melting industry in Upper Silesia, South Poland. *Journal of Geochemical Exploration*, 237-250.

Duggan M.J., Inskip M.J., 1985. Childhood exposure to lead in surface dust and soil: a community health problem. *Public Health Review* 13, 1-54.

EAT2, 2011. Etude de l'alimentation totale française 2. Rapport Anses, 346 pp.

EFSA, 2009. Cadmium in food – Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain, EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), doi:10.2903/j.efsa.2009.980.

EFSA, 2010. Parma, Italy Scientific Opinion on Lead in Food, EFSA panel on contaminants in the Food Chain (CONTAM) EFSA Journal, 8(4):1570.

EFSA, 2013. Panel on contaminants in the food chain. Scientific opinion on lead in food.

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.

ENSTIMD, 1982. Synthèse des mesures effectuées sur des prélèvements de terre et de végétaux dans les environs de l'usine de Auby de la Compagnie Royale Asturienne des Mines (CRAM). Ecole Nationale Supérieure des Techniques Industrielles et des Mines de Douai, Douai.

Ernhart C.B., 2006. Effects of lead on IQ in children. Environmental Health Perspective 114, A85-A86.

Etchevers A., Lecoffre C., Le Tertre A., Le Strat Y., Groupe Investigateurs Saturn-Inf, De Launay, C., et al., 2010. Imprégnation des enfants par le plomb en France en 2008-2009. BEH

Feng X.D., Dang Z., Huang W.L., Yang C., 2009. Chemical speciation of fine particle bound trace metals. *International Journal of Environmental Science and Technology* 6, 337-346.

Ferguson C., Nathanail P., McCaffrey C., Earl N., Foster N.D., Gillet A.G. et al., 2003. Method for deriving sitespecific human health assessment criteria for contaminants in soil. SNIFFER-Report, No. LQ01, Marlow, Foundation of Water Research (FWR).

Fernández-Espinoza A.J., Rodríguez M.T., Barragán de la Rosa F.J., Jiménez Sánchez J.C., 2002. A chemical speciation of trace metals for fine urban particles. *Atmospheric Environment* 36, 773-780.

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

Freeman G.B., Johnson J.D., Liao S.C., Feder P.I., Davis A.O., Ruby M.V., Schoof R.A., Chaney R.L., Bergstrom P.D., 1994. Absolute bioavailability of lead acetate and mining waste lead in rats. *Toxicology* 91, 151-163.

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

Freeman G.B., Dill J.A., Johnson J.D., Kurtz P.J., Parham F., Mathews H.B., 1996. Comparative absorption of lead from contaminated soil and lead salts by weanling fisher 344 rats. *Fundamental and Applied Toxicology* 33, 109-119.

Frelon S., Chazel V., Tourlonias E., Blanchardon E., Bouisset P., Pourcelot L., Paquet F., 2007. Risk assessment after internal exposure to black sand from Camargue: uptake and prospective dose calculation. *Radiation Protection Dosimetry* 127, 64-67.

Fréry N., Saoudi A., Garnier R., Zeghnoun A., Falq G., 2011. Exposition de la population française aux substances chimiques de l'environnement. Saint-Maurice : Institut de veille sanitaire, 151 pp.

Fu J., Cui Y., 2013. In vitro digestion/Caco-2 cell model to estimate cadmium and lead bioaccessibility/bioavailability in two vegetables: the influence of cooking and additives. *Food and Chemical Toxicology* 59, 215-221.

Gamble J.L., 1942. Chemical anatomy, physiology, and pathology of extracellular fluid: a lecture syllabus. 6th edn. Harvard University Press, Cambridge, 167 pp.

Garmo O.A., Royset O., Steinnes E., Flaten T.P., 2003. Performance study of diffusive gradients in thin films for 55 elements. *Analytical Chemistry* 75, 3573-3580.

Gimbert F., 2006. Cinétiques de transfert de polluants métalliques du sol à l'escargot. Université de Franche-Comté.

Gimpel J., Zhang H., Hutchinson W., Davison W., 2001. Effect of solution composition, flow and deployment time on the measurement of trace metals by the diffusive gradient in thin films technique. *Analytica Chimica Acta* 448, 93-103.

Glorennec P., Ledrans M., Dor F., Rouil L., Pelinski P., et al., 2002. Dépistage du saturnisme infantile autour des sources industrielles de plomb. Analyse de la pertinence de la mise en œuvre d'un dépistage : du diagnostic environnemental à l'estimation des expositions. Tome 1, Saint Maurice : Institut de veille sanitaire, 72 pp.

Godin P., 1986. Modèles pour l'évaluation de la pollution des sols. Thèse de Docteur-ingénieur de l'INRA Paris-Grignon, Paris, France.

Gómez D., Dos Santos M., Fujiwara F., Polla G., Marrero J., Dawidowski L., Smichowski P., 2007. Fractionation of metals and metalloids by chemical bonding from particles accumulated by electrostatic precipitation in an Argentine thermal power plant. *Microchemical Journal* 85, 276-284.

Goodman J.E., Prueitt R.L., Thakali S., Oller A.R., 2011. The nickel ion bioavailability model of the carcinogenic potential of nickel-containing substances in the lung. *Critical Reviews in Toxicology* 41, 142-174.

Goyer R.A., Clarkson T.W., 2001. Toxic effects of metals. In: Klassen C.D. (Ed.), Casarett and Soull's Toxicology: the basic science of poisons, 6th edn., McGraw-Hill, New York, pp. 811-868.

Gray J.E., Plumlee G.S., Morman S.A., Higueras P.L., Crock J.G., Lowers H.A., Witten M.L., 2010. In vitro studies evaluating leaching of mercury from mine waste calcine using simulated human body fluids. *Environmental Science and Technology* 44, 4782-4788.

Grøn C., Andersen L., 2003. Human bioaccessibility of heavy metals and PAH from soil. Environmental Project No. 840, Technology Programme for Soil and Groundwater Contamination. Danish Environmental Protection Agency, 113 pp.

Grøn C., 2005. Test for bioaccessibility of metals and PAH from soil – Test selection, validation an application. Report of Environment Agency, 133 pp.

Gulson B.L., Davis J.J., Mizon K.J., Korsch M.J., Bawden-Smith J., 1995. Sources of lead in soil and dust and the use of dust fallout as a sampling medium. *Science of the Total Environment* 166, 245-262.

Guney M., Zagury G.J., Dogan N., Onay T.T., 2010. Exposure assessment and risk characterization from trace elements following soil ingestion by children exposed to playgrounds, parks and picnic areas. *Journal of Hazardous Materials* 182, 656-664.

Gunier R.B., Jerrett M., Smith D.R., Jursa T., Yousefi P., Camacho J., Hubbard A., Eskenazi B., Bradman A., 2014. Determinants of manganese levels in house dust samples from the CHAMACOS cohort. *Science of the Total Environment* 497-497, 360-368.

Gutiérrez-Castillo M.E., Olivos-Ortiz M., De Vizcaya-Ruiz A., Cebrián M.E., 2005. Chemical characterization of extractable water soluble matter associated with PM10 from Mexico City during 2000. *Chemosphere* 61, 701-710.

Guyton A.C., 1991. Textbook of medical physiology. Saunders W.B. (Ed.), Philadelphia, PA.

Gzyl J., 1990. Lead and cadmium contamination of soil and vegetables in the Upper Silesia region of Poland. *Science of the Total Environment* 96, 199-200.

Hack A., Selenka F., 1996. Mobilization of PAH and PCB from contaminated soil using a digestive tract model. *Toxicology Letters* 88, 199-210.

Hagens W., Lijzen J.P., Sips A., Oomen A.G., 2008. The bioaccessibility and relative bioavailability of lead from soils for fasted and fed conditions. Bd. 711701080 von RIVM report. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), Bilthoven.

Hamad S.H., Schauer J.J., Shafer M.M., Al-Rheem E.A., Skaar P.S., Heo J., Tejedor-Tejedor I., 2014. Risk assessment of total and bioavailable potentially toxic elements (PTEs) in urban soils of Baghdad-Iraq. *Science of the Total Environment* 494-495, 39-48.

Hamel S.C., Buckley B., Lioy P.J., 1998. Bioaccessibility of metals in soils for different liquid to solid ratios in synthetic gastric fluid. *Environmental Science & Technology* 32, 358-362.

Hamel S.C., Ellickson K.M., Lioy P.J., 1999. The estimation of the bioaccessibility of heavy metals in soils using artificial biofluids by two novel methods: mass-balance and soil recapture. *Science of the Total Environment* 244, 273-283.

Han S., Naito W., Hanai Y., Masunaga S., 2013. Evaluation of trace metals bioavailability in Japanese river waters using DGT and a chemical equilibrium model. *Water Research* 47, 4880-4892.

Harper M.P., Davison W., Tych W., 2000. DIFS-a modeling and simulation tool for DGT induced trace metal remobilization in sediments and soils. *Environmental Modelling & Software* 15, 55-66.

Hawley J.K., 1985. Assessment of health risks from exposure to contaminated soil. Risk Analysis 5, 289-302.

HCSP (Haut Conseil de la Santé Publique), 2014. Expositions au plomb : Détermination de nouveaux objectifs de gestion. Rapport, Collection Avis et Rapports, 101 pp.

Heal M.R., Hibbs L.R., Agius R.M., Beverland I.J., 2005. Total and water-soluble trace metal content of urban background PM10, PM2.5 and black smoke in Edinburgh, UK. *Atmospheric Environment* 39, 1417-1430.

Helrich K., 1990. Official method of analysis of the association of official analytical chemists. AOAC, Arlington.

Herting G., Odnevall Wallinder I., Leygraf C., 2006. Factors that influence the release of metals from stainless steels exposed to physiological media. *Corrosion Science* 48, 2120-2132.

Herting G., Odnevall Wallinder I., Leygraf C., 2007. Metal release from various grades of stainless steel exposed to synthetic body fluids. *Corrosion Science* 49, 103–111.

Hettiarachchi G.M., Pierzynski G.M., 2004. Soil lead bioavailability and in situ remediation of lead-contaminated soils: a review. *Environmental Progress* 23, 79-93.

Heyman C., Haeghebaert S., Farvacques C., Kalache N., 2008. Pertinence d'un dépistage du saturnisme et de mesures de l'imprégnation de la population en cadmium sur le secteur de Mortagne du Nord. Institut de Veille Sanitaire, rapport final, 42 pp.

Heyman C., Andrieu A., Gueudre C., Mazzuca M., 2014. Dépistage du saturnisme infantile chez les enfants âgés de 2 à 3 ans autour de l'ancien site Metaleurop. 3^{èmes} Rencontres Nationales de la Recherche sur les Sites et Sols pollués, ADEME, Paris, 18-19 Novembre 2014.

Hofmann W., Asgharian B., 2003. The effect of lung structure on mucociliary clearance and particle retention in human and rat lungs. *Toxicological Sciences* 73, 448-456.

Hornero-Mendez D., Minguez-Mosquera M.I., 2007. Bioaccessibility of carotenes from carrots: effect of cooking and addition of oil. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8, 407-412.

Hough R.L., Breward N., Young S.D., Crout N.M.J., Tye A.M., Moir A.M., Thornton I., 2004. Assessing potential risk of heavy metal exposure from consumption of home-produced vegetables by urban populations. *Environmental Health Perspectives* 112, 215-221.

Huang R.I., Tan Z.L., Xing T.X., Pan Y.F., Lee T.J., 2000. An in vitro method for the estimation of ileal crude protein and amino acids digestability using the dialysis tubing for pig feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology* 88, 79-89.

Hur S.J., Lim B.O., Decker E.A., McClements D.J., 2011. In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry* 125, 1-12.

INRS, 1997. Fiche toxicologique du cadmium n°60.

INRS, 1998. Fiche toxicologique du plomb n°59.

INRS, 2002. Fiche toxicologique du zinc n°75.

INSERM- Saturnisme : Quelles stratégies de dépistage chez l'enfant ? Edition 2008.

InVS, 2002. Dépistage du saturnisme infantile autour des sources industrielles de plomb – Analyse de la pertinence de la mise en œuvre d'un dépistage : du diagnostic environnemental à l'estimation des expositions. Mars 2002, Tome 1 : 1-72.

Jacquet A., 2007. Quantité de sol ingéré recommandée pour un enfant : un choix trop conservateur ? Thèse de doctorat en pharmacie, Université Paris V René Descartes.

Jarup L., Pershagen O., Wall S., 1989. Cumulative arsenic exposure and lung cancer in smelter workers – a casecontrol study. *American Journal of Industrial Medicine* 15, 31-41.

JECFA, 1993. Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants. Geneva, Joint FAO/WHO expert committee on food additives, WHO Technical Report Series, No.837.

JECFA, 2010. Joint FAO.WHO expert committee on food additives. Seventy-third meeting, Geneva, 8-17 June 2010, Summary and Conclusions.

Jusko T.A., Henderson C.R., Lanphear B.P., Cory-Slechta D.A., Parsons P.J., Canfield R.L., 2008. Blood lead concentrations < 10 micorg/dL and child intelligence at 6 years of age. *Environmental Health Perspectives* 116, 243-248.

Kanapilly G.M., 1977. Alveolar microenvironment and its relationship to the retention and transport into the blood of aerosols deposited in the alveoli. *Health Physics* 32, 89-100.

Karthikeyan S., Joshi U.M., Balasubramanian R., 2006. Microwave assisted sample preparation for determining water-soluble fraction of trace elements in urban airborne particulate matter: evaluation of bioavailability. *Analytica Chimica Acta* 576, 23-30.

Kedjarune U., Migasena P., Changbumrung S., Pongpaew P., Tungtrongchitr R., 1997. Flow rate and composition of whole saliva in children from rural and urban Thailand with different caries prevalence and dietary intake. *Caries Research* 31, 148-154.

Kelley N.E., Brauning S.E., Schoof R.A., Ruby M.V., 2002. Assessing oral bioavailability of metals in soil. Book reviews.

Kimbrough R., Le Vois M., Webb D., 1995. Survey of lead exposure around a closed lead smelter. *Pediatrics* 95, 550-554.

Kissel J.C., Richter K.Y., Fenske R.A., 1996. Field measurement of dermal soil loading attributable to various activities: implications for exposure assessment. *Risk Analysis* 16, 115-152.

Koplik R., Mestek O., Kominkova J., Borkova M., Suchanek M., 2004. Effect of cooking on phosphorous and trace elements species in peas. *Food Chemistry* 85, 31-39.

Kreyling W.G., Semmler M., Erbe F., Mayer P., Takenaka S., Schultz H., Oberdorster G., Ziesenis A., 2002. Ultrafine insoluble iridium particles are negligibly translocated from lung epithelium to extrapulmonary organs. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 65, 1513-1530.

Lamb D.T., Ming H., Megharaj M., Naidu R., 2009. Heavy metal (Cu, Zn, Cd and Pb) partitioning and bioaccessibility in uncontaminated and long-term contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials* 171, 1150-1706.

Lanphear B.P., Hornung R., Khoury J., Yolton K., Baghurst P., Bellinger D.C., 2005. Low-level environmental lead exposure and children's intellectual function: an international pooled analysis. *Environmental Health Perspectives* 113, 894-999.
Lauwerys R., Roels H., Bernard A., Buchet J.P., 1980. Renal response to cadmium in a population living in a nonferrous smelter area in Belgium. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 45, 271-274.

Laxen D.P.H., Raab G.M., Fulton M., 1987. Children's blood lead and exposure to lead in household dust and water – a basis for an environmental standard for lead in dust. *Science of the Total Environment* 66, 235-244.

Lehert B.E., 1993. Defense mechanisms against inhaled particles and associated particle-cell interactions. In Guthrie G.D., Mossman B.T. (Eds), Health effects in mineral dusts, Reviews of Mineralogy, vol. 28, Mineralogical Society of America, Washington, DC, pp. 427–269.

Leroyer A., Hemon D., Nisse C., Auque G., Mazzuca M., Haguenoer J.M., 2001. Determinants of cadmium burden levels in a population of children living in the vicinity of nonferrous smelters. *Environmental Research Section A* 87, 147-159.

Li W., Zhao J., Li C., Kiser S., Cornett R.J., 2006. Speciation measurements of uranium in alkaline waters using diffusive gradients in thin films technique. *Analytica Chimica Acta* 575, 274-280.

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.

Lison D., Lauwerys R., 1992. Study of the mechanism responsible for the elective toxicity of tungsten carbide cobalt powder toward macrophages. *Toxicology Letters* 60, 203-210.

Lison D., Lauwerys R., 1994. Cobalt bioavailability from hard metal particles – Further evidence that cobalt alone is not responsible for the toxicity of hard metal particles. *Archives of Toxicology* 68, 528-531.

Lopareva-Pohu A., Pourrut B., Waterlot C., Garçon G., Bidar G., Pruvot C., Shirali P., Douay F., 2011. Assessment of fly ash-aided phytostabilisation of highly contaminated soils after 8-year field trial. Part 1. Influence on soil parameters and metal extractability. *Science of the Total Environment* 409, 647-654.

Lothenbach B., Furrer G., Schärli H., Schulin R., 1999. Immobilization of zinc and cadmium by montmorillonite compounds: Effect of aging and subsequent acidification. *Environmental Science & Technology* 33, 2945-2952.

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.

Luttringer M., De Cormis L., 1979. La pollution par les métaux lourds à Noyelles-Godault et ses environs (Pas de Calais). INRA – Station d'Etude de la pollution atmosphérique, 12 pp.

Macklin C.C., 1955. Pulmonary sumps, dust accumulations, alveolar fluid and lymph vessels. *Acta Anatomica* 23, 1-33.

Maddaloni M., Lolacono N., Manton W., Blum C., Drexler J., Graziano J., 1998. Bioavailability of soilborne lead in adults, by stable isotope dilution. *Environmental Health Perspectives* 106, 1589-1594.

Marschner B., Welge P., Hack A., Wittsiepe J., Wilhelm M., 2006. Comparison of soil Pb in vitro bioaccessibility and in vivo bioavailability with Pb pools from a sequential soil extraction. *Environmental Science & Technology* 40, 2812-2818.

Maulvault A.L., Machado R., Afonso C., Lourenco H.M., Nunes M.L., Coehlo I., Langerholc T., Marques A., 2011. Bioaccessibility of Hg, Cd and As in cooked black scabbard fish and edible crab. *Food and Chemical Toxicology* 49, 2808-2815.

May P.M., Murray K., 1991a. JESS, a joint expert speciation system - I. Raison d'être. Talanta 38, 1409-1417.

May P.M., Murray K., 1991b. JESS, a joint expert speciation system – II. The thermodynamic database. *Talanta* 38, 1419-1426.

May P.M., Murray K., 1993. JESS, a joint expert speciation system – III. Surrogate functions. *Talanta* 40, 819-825.

Medlin E.A., 1997. An in vitro method for estimating the relative bioavailability of lead in humans. Master's thesis, Department of Geological Sciences, University of Colorado at Boulder.

MEDD, 2007. La démarche d'interprétation de l'état des milieux. Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable, 42 pp.

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* 7, 317-327.

Meiring J.J., Borm P.J., Bagate K., Semmler M., Seitz J., Takenaka S., Kreyling W.G., 2005. The influence of hydrogen peroxide and histamine on lung permeability and translocation of iridium nanoparticles in the isolated perfused rat lung. *Particle and Fibre Toxicology* 27, 2-3.

Midlander K., Pan J., Leygraf C., 2006. Elaboration of a test method for the study of metal release from stainless steel particles in artificial biological media. *Corrosion Science* 48, 2855-2866.

Midlander K., Wallinder I.O., Leygraf C., 2007. In vitro studies of copper release from powder particles in synthetic biological media. *Environmental Pollution* 145, 51-59.

Mielke H.W., Reagan P.L., 1998. Soil is an important pathway of human lead exposure. *Environmental Health Perspectives* 106, 1217-1229.

Minekus M., Marteau P., Hayenaar R., Huisintveld J.H.J., 1995. A multicompartmental dynamic computercontrolled model simulating the stomach and small-intestine. *Alta-Alternatives to Laboratory Animals* 23, 197-209.

Molly K., Woestyne M.V., Verstraete W., 1993. Development of a 5-step multichamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. *Applied Microbiology and Biotechnology* 39, 254-258.

Morawska L., Moore M.R., Ristovski Z.D., 2004. Health impacts of ultrafine particles. Desktop literature review and analysis. Canberra, Department of the Environment and Heritage.

Morrison A.L., Gulson B.L., 2007. Preliminary findings of chemistry and bioaccessibility in base metal smelter slags. *Science of the Total Environment* 382, 30-42.

Mounicou S., Szpunar J., Andrey D., Blake C., Lobinski R., 2002. Development of a sequential enzymolysis approach for the evaluation of the bioaccessibility of Cd and Pb from cocoa. *Analyst* 127, 1638-1641.

Mullins M.J.P., Norman J.B., 1994. Solubility of metals in windblown dust from mine waste dump sites. *Applied Occupational and Environmental Hygiene* 9, 218-223.

Mwinyihja M., Strachan N.J.C., Rotariu O., Standing D., Meharg A., Killham K., 2006. Ecotoxicological screening of Kenyan tannery dust using a luminescent-based bacterial biosensor. *International Journal of Environmental Health Research* 16, 47-58.

Nemmar A., Vanbilloen H., Hoylaerts F., Hoet P.H., Verbruggen A., Nemery B., 2001. Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 164, 1665-1668.

Nieboer E., Fletcher G.G., Thomassen Y., 1999. Relevance of reactivity determinants of exposure assessment and biological monitoring of the elements. *Journal of Environmental Monitoring* 1, 1-14.

Nieminen T.M., Derome J., Helmisaari H.S., 1999. Interactions between precipitation and Scots pine canopies along a heavy-metal pollution gradient. *Environmental Pollution* 106, 129-137.

Niu J., Rasmussen P.E., Hassan N.M., Vincent R., 2010. Concentration distribution and bioaccessibility of trace elements in nano and fine urban airborne particulate matter: influence of particle size. *Water Air and Soil Pollution* 213, 211-225.

Oberdörster G., Sharp Z., Atudorei V., elder A., Gelein R., Lunts A., Kreyling W., Cox C., 2002. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health A* 65, 1531-1543.

Oller A.R., Cappellini D., Henderson R.G., Bates H.K., 2009. Comparison of nickel release in solutions used for the identification of water-soluble nickel exposures and in synthetic lung fluids. *Journal of Environmental Monitoring* 11, 823-829.

Oomen A.G., 2000. Determination of oral bioavailability of soil-borne contaminants. PhD, University of Utrecht.

Oomen A.G., Hack A., Minekus M., Zeijdner E., Cornelis C., Schoeters G., Verstraete W., von de Wiele T., Wragg J., Rompelberg C.J.M., Sips A.J.A.M., Wijnen J.H.V., 2002. Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. *Environmental Science & Technology* 36, 3326-3334.

Oomen A.G., Rompelberg C.J.M., Bruil M.A., Dobbe C.J.G., Pereboom D.P.K.H., Sips A.J.A.M., 2003a. Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44, 281-287.

Oomen A.G., Tolls J., Sips A.J.A.M., Van den Hoop M.A.G.T., 2003b. Lead speciation in artificial human digestive fluid. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44, 107-115.

Oomen A.G., Tolls J., Sips A.J.A.M., Groten J.P., 2003c. In vitro intestinal lead uptake and transport in relation to speciation. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44, 116-124.

Oomen A., Brandon E., Swartjes F.A., Sips A., 2006. How can information on oral bioavailability improve human health risk assessment for lead-contaminated-soils? Implementation and scientific basis. RIVM report, 108 pp.

ORS PACA-InVS, 2001. Evaluation des conséquences sanitaires et environnementales de la pollution d'origine industrielle au cadmium autour du site TLM dans le 15e arrondissement de Marseille, 146 pp.

Paustenbach D.J., Meyer D.M., Sheehan P.J., Lau V., 1991. An assessment and quantitative uncertainty analysis of the health risks to workers exposed to chromium contaminated soils. *Toxicology and Industrial Health* 7, 159-196.

Paustenbach D.J., 2000. The practice of exposure assessment: a state of the art review. *Toxicology and Environment Health, Part B* 3, 179-291.

Peijnenburg W.J., Posthuma L., Eijsackers H.J., Allen H.E., 1997. A conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 37, 163-172.

Peijnenburg W.J., Jager T., 2003. Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: matrix issues. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 63-77.

Pichard A., 2003a. Plomb et ses dérivés, INERIS : 90.

Pichard A., 2003b. Zinc et ses dérivés, INERIS : 62.

Pichard A., 2004. Cadmium et ses dérivés, INERIS : 50.

Plumlee G.S., Ziegler T.L., 2003. The medical geochemistry of dusts, soils and other earth materials. In: Lollar B.S., Holland H.D., Turekian K.K. (Eds.), Environmental Geochemistry, Vol. 9, Treatise on Geochemistry, Elsevier Ltd., Oxford, UK, pp. 263-310.

Pope C.A., Burnett R.T., Thun M.J., Cale E.E., Krewsi D., Ito K., Thurston G.D., 2002. Lung cancer, cardiopulmonary mortality and long-term exposure to fine particulate air pollution. Journal of the American Medical Association 287, 1132-1141.

Porter S.K., Scheckel K.G., Impellitteri C.A., Ryan J.A., 2004. Toxic metals in the environment: thermodynamic considerations for possible immobilization strategies for Pb, Cd, As, and Hg. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 6, 495-604.

Pourrut B., Lopareva-Pohu A., Pruvot C., Graçon G., Verdin A., Waterlot C., Bidar G., Shirali P., Douay F., 2011. Assessment of fly ash-aided phytostabilisation of highly contaminated soils after an 8-year field trial. Part 2. Influence on plants. *Science of the Total Environment* 409, 4504-4510.

Pritchard R.J., Ghio A.J., Lehmann J.R., Winsett D.W., Tepper J.S., Park P., Gilmour M.I., Dreher K.L., Costa D.L., 1996. Oxidant generation and lung injury after particulate air pollutant exposure increase with the concentrations of associated metals. *Inhalation Toxicology* 8, 457-477.

Prouvost H., Declercq C., 2007. Impact des particules en suspension sur la santé respiratoire des enfants – Intérêt et faisabilité de l'étude d'un panel d'enfants lillois. Rapport ORS réalisé pour le Conseil Régional Nord-Pas de Calais, 42 pp.

Pruvot C., Douay F., Fourrier H., Waterlot C., 2006. Heavy metals in soil, crops and grass as a source of human exposure in the former mining areas. *Journal of Soils and Sediments* 6, 215-220.

Quiros-Alcala L., Bradman A., Nishioka M., Harnly M.E., Hubbard A., McKone T.E., Eskenazi B., 2011. Concentrations and loadings of polybrominated diphenyl ethers in dust from low-income households in California. *Environment International* 37, 592-596.

Rabinowitz M.B., Waternaux C., Bellinger D.C., Leviton A., Needleman H.L., 1985. Environmental correlates of infant blood lead levels in Boston. *Environmental Research* 38, 96-107.

Rasmussen P.E., Subramanian K.S., Jessiman B., 2001. A multi-element profile of house dust in relation to exterior dust and soils in the city of Ottawa, Canada. *Science of the Total Environment* 267, 125-140.

Rauret G., Lopez-Sanchez J.F., Sahuquillo A., Rubio R., Davidson C., Ure A., Quevauviller P., 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.

Reeder R.J., Schoomen M.A.A., 2006. Metal speciation and its role in bioaccessibility and bioavailability. *Mineralogical and Geochemistry* 64, 59-113.

Rennard S.I., Basset G., Lecossier D., O'Donnell K.M., Pinkston P., Martin P.G., crystal R.G., 1986. Estimation of volume of epithelial lining fluid recovered by lavage using urea as marker of dilution. *Journal of Applied Physiology* 60, 532-538.

Riley T., Christopher D., Arp J., Casazza A., Colombani A., Cooper A., Dey M., Maas J., Mitchell J., Reiners M., Sigari N., Tougas T., Lyapustina S., 2012. Challenges with developing in vitro dissolution tests for orally inhaled products (OIPs). *AAPS PharmSciTech* 13, 978-989.

RNSP & INSERM, 1997. Surveillance de la population française vis-à-vis du risque saturnin. Réseau national de santé publique et Institut national de la santé et de la recherche médicale, 90 pp.

Rodriguez R.R., Basta N.T., 1999. An in vitro gastrointestinal method to estimate bioavailable arsenic in contaminated soils and solid media. *Environmental Science & Technology* 33, 642-649.

Roesems G., Hoet P.H.M., Demedts M., Nemery B., 1997. In vitro toxicity of cobalt and hard metal dust in rat and human type II pneumocytes. *Pharmacology & Toxicology* 81, 74-80.

Roullier J.L., Tusseau-Vuillemin M.H., Coquery M., Geffard O., Garric J., 2008. Measurement of dynamic mobilization of trace metals in sediments using DGT and comparison with bioaccumulation in *Chironomus riparius*: First results of an experimental study. *Chemosphere* 70, 925-932.

Ruby M.V., Davis A., Link T.E., Schoof R., Chaney R.L., Freeman G.B., Bergstrom P., 1993. Development of an in vitro screening-test to evaluate the in vivo bioaccessibility of ingested mine-waste lead. *Environmental Science & Technology* 26, 1242-1248.

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.

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.

Ruello M.L., Sileno M., Sani D., Fava G., 2008. DGT use in contaminated site characterization. The importance of heavy metal site specific behavior. *Chemosphere* 70, 1135-1140.

Sadakane K., Ichinose T., Takano H., Yanagisawa R., Sagai M., Yoshikawa T., Shibamoto T., 2002. Murine strain differences in airway inflammation induced by diesel exhaust particles and house dust mite allergen. *International Archives of Allergy and Immunology* 128, 220-228.

Saikat S., Barnes B., Westwood D., 2007. A review of laboratory results for bioaccessibility values of arsenic, lead and nickel in contaminated UK soils. *Journal of Environmental Science and Health Part A* 42, 1213-1221.

Saint-Georges F., Garcon G., Escande F., Abbas I., Verdin A., Gosset P., Mulliez P., Shirali P., 2009. Loss of heterozygosity and/or microsatellite instability in multiple critical regions of 3p and 9p chromosomes in human epithelial lung cells (L132) exposed to air pollution particulate matter (PM2.5). Genotoxicity: evaluation, Testing and Prediction. ISBN 978-1-60741-714-9.

Saminathan S.K.M., Sarkar D., Andra S.S., Datta R., 2010. Lead fractionation and bioaccessibility in contaminated soils with variable chemical properties. *Chemical Speciation and Bioavailability* 22, 215-225.

Scally S., Davison W., Zhang H., 2006. Diffusion coefficients of metals and metal complexes in hydrogels used in diffusive gradients in thin films. *Analytica Chimica Acta* 558, 222-229.

Schroder 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.

Schwartz J., Dockery D.W., Neas L.M., 1996. Is daily mortality associated specifically with fine particulates? *Journal of the Air & Waste Management Association* 46, 927-939.

Sips A.J.A.M., Bruil M.A., Dobbe C.J.E., Klaassen R., Pereboom D.P.K.H., Rompelberg C.J.M., 1998. Feasability of an in-vitro digestion model for determining bioaccessibility of contaminants from ingested soil. National Institute of Public Health and the Environment.

Sips A.J.A.M., Bruil M.A., Dobbe C.J.G., 2001. Bioaccessibility of contaminants from ingested soil in humans. Method development and research in the bioaccessibility of lead and benzo[a]pyrene. RIVM report 711701012/2001, pp 22-40.

Son Y.J., McConville J.T., 2009. Development of a standardized dissolution test method for inhaled pharmaceutical formulations. *International Journal of Pharmaceutics* 382, 15-22.

Son Y.J., Horng M., Copley M., McConville J.T., 2010. Optimization of an in vitro dissolution test method for inhalation formulations. *Dissolution Technologies* 17, 6-13.

Soukup J.M., Ghio A.J., Becker S., 2000. Soluble components of Utah Valley particulate pollution alter alveolar macrophage function in vivo and in vitro. *Inhalation Toxicology* 12, 401-414.

Starr J., Graham S., Stout II D., Andrews K., Nishioka M., 2008. Pyrethroid pesticides and their metabolites in vacuum cleaner dust collected from homes and day-care centers. *Environmental Research* 108, 271-279.

Sterckeman T., Douay F., Proix N., Fourrier H., 2000. Vertical distribution of Cd, Pb and Zn in soils near smelters in the North of France. *Environmental Pollution* 107, 377-389.

Sterckeman T., Douay F., Proix N., Fourrier H., Perdrix E., 2002. Assessment of the contamination of cultivated soils by eighteen trace elements around smelters in the North of France. *Water Air and Soil Pollution* 135, 173-194.

Sterling D.A., Roegner K.C., Lewis R.D., Luke D.A., Wilder L.C., Burchette S.M., 1999. Evaluation of four sampling methods for determining exposure of children to lead-contaminated household dust. *Environmental Research Section A* 81, 130-141.

Stopford W., Turner J., Cappellini D., Brock T., 2003. Bioaccessibility testing of cobalt compounds. *Journal of Environmental Monitoring* 5, 675-680.

Sun G.X., Van de Wiele T., Alava P., Tack F., Laing G.D., 2012. Arsenic in cooked rice: effect of chemical, enzymatic and microbial processes on bioaccessibility and speciation in the human gastrointestinal tract. *Environmental Pollution* 162, 241-246.

Takaya M., Shinohara Y., Serita F., Ono-Ogasawara M., Otaki N., Toya T., Takata A., Yoshida K., Kohyama N., 2006. Dissolution of functional materials and rare earth oxides into pseudo alveolar fluid. *Industrial Health* 44, 639-644.

Tang X.Y., Cui Y.S., Duan J., Tang L., 2008. Pilot study of temporal variations in lead bioaccessibility and chemical fractionation in some Chinese soils. *Journal of Hazardous Materials* 160, 29-36.

Taylor D.M., Williams D.R., 1998. Bio-inorganic chemistry and its pharmaceutical applications. In: Smith H.J. (Ed.), Introduction to the principles of drug design and action, Harwood Academic, Amsterdam, pp. 509-538.

Tessier A., Campbell P.G.C., Bisson M., 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Analytical Chemistry* 51, 844-850.

Tong S., von Schirnding Y.E., Prapamontol T., 2000. Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions. *Bulletin of the World Health Organisation* 78, 1068-1077.

Trowbridge P.R., Burmaster D.E., 1997. A parametric distribution for the fraction of outdoor soil in indoor dust. *Journal of Soil Contamination* 6, 161-168.

Tusseau-Vuillemin M.H., Gilbin R., Taillefert M., 2003. A dynamic numerical model to characterize labile metal complexes collected with diffusion gradient in thin film devices. *Environmental Science and Technology* 37, 1645-1652.

Tusseau-Vuillemin M.H., Gilbin R., Bakkaus E., Garric J., 2004. DGT performance in evaluating the toxicity of copper to *Daphnia magna* in aqueous solutions containing various organic ligands. Environmental Toxicology and Chemistry 23, 2154-2161.

Twining J., Mcglinn P., Loi E., Smith K., Gieré R., 2005. Risk ranking of bioaccessible metals from fly ash dissolved in simulated lung and gut fluids. *Environmental Science & Technology* 39, 7749-7756.

USEPA, 2007a. Guidance for evaluating the oral bioavailability of metals in soils for use in human health risk assessment. OSWER 9285.7-80, Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington, DC, USA.

USEPA, 2007b. Estimation of relative bioavailability of lead in soil and soil-like materials using in vivo and in vitro methods. OSWER 9285.7-77, Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington, DC, USA.

USEPA, 2007c. Integrated risk information system-database, Philadelphia PA, Washington, DC, USA.

Uzu G., Sobanska S., Aliouane Y., Pradere P., Dumat C., 2009. Study of lead phytoavailability for atmospheric industrial micronic and sub-micronic particles in relation with lead speciation. *Environmental Pollution* 157, 1178-1185.

Vallyathan V., Pack D., Leonard S., Lawson R., Schenker M., Castranova V., 2007. Comparative in vitro toxicity of grape- and citrus-farm dusts. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 70, 95-106.

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.

Vangronsveld J., Carleer R., Clijster H., 1994. Transfert of metals and metalloids from soil to man through vegetables cultivated in polluted gardens: risk assessment and methods for immobilization of these elements in soils. 6th Internation Conference of Environmental Contamination, Delphi, 142-145.

Van Leeuwen H.P., 1999. Metal speciation dynamics and bioavailability: Inert and labile complexes. *Environmental Science & Technology* 33, 3743-3748.

Van Oort F., Médard T., Toine J., Bourennane H., Cambier P., Lamy I., Citeau L., Nahmani J., 2009. Pollutions métalliques : distributions hétérogènes du Zn, Pb, Cd et Cu et relations avec l'usage des sols. In: Contaminations métalliques des agrosystèmes et écosystèmes péri-urbains. Edited by Cambier, P., Scwartz, C., Van Oort, F., Quae editions, 15-24.

Vanrullen F., Pruvot C., Douay F., 2007. Caractérisation du compartiment "poussières extérieures" dans un environnement urbain fortement contaminé par les métaux lourds. Rapport ISA Lille, 58 pp.

Violante A., Ricciardella M., Pigna M., 2003. Adsorption of heavy metals on mixed Fe-Al oxides in the absence or presence of inorganic ligands. *Water, Air, and Soil Pollution* 145, 289-306.

Voutsa D., Samara C., 2002. Labile and bioaccessible fractions of heavy metals in the airborne particulate matter from urban and industrial areas. *Atmospheric Environment* 36, 3583-3590.

Wang K.S., Chiang K.Y., Lin K.L., Sun C.J., 2001. Effects of a water-extraction process on heavy metal behavior in municipal solid waste incinerator fly ash. *Hydrometallurgy* 62, 73-81.

Weibel E.R., 1973. Morphological basis of alveolar-capillary gas exchange. Physiological Reviews 53, 419-495.

White P.D., Van Leeuwen P., Davis B.D., Maddaloni M., Hogan K.A., Marcus A.H., 1998. The conceptual structure of the integrated exposure uptake biokinetic model for lead in children. *Environmental Health Perspectives* 106, 1467-1484.

Witschger O., Fabries J., 2005. Particules ultra-fines et santé au travail. Sources et caractérisation de l'exposition. Hygiène et sécurité au travail – Cahier de notes documentaires 2228-199, 37-54.

Wragg J., Klinck B., 2007. The bioaccessibility of lead from Welsh mine waste using a respiratory uptake test. *Journal of Environmental Science and Health Part A* 42, 1223-1231.

Wragg J., Cave M.R., Basta N., Brandon E., Casteel S.E.B., Denys S., Grøn 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.

Yapici T., Fasfous I.I., Murimboh J., Chakrabarti C.L., 2008. Investigation of DGT as a metal speciation technique for municipal wastes and aqueous mine effluents. *Analytica Chimica Acta* 622, 70-76.

Zanetti G., Fubini B., 1997. Surface interaction between metallic cobalt and tungsten carbide particles as a primary cause of hard metal lung disease. *Journal of Materials Chemistry* 7, 1647-1654.

Zhang H., Davison W., Miller S., Tych W., 1995. In situ high resolution measurements of fluxes of Ni, Cu, Fe, and Mn and concentrations of Zn and Cd in porewaters by DGT. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 59, 4181-4192.

Zhang H., Davison W., 2000. Direct in situ measurements of labile inorganic and organically bound metal species in synthetic solutions and natural waters using diffusive gradients in thin films. *Analytical Chemistry* 72, 4447-4457.

Zhang Z., Kleinstreuer C., Donohue J., Kim C., 2005. Comparison of micro- and nano-size particle depositions in a human upper airway model. *Journal of Aerosol Science* 36, 211-233.

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.