

RAPPORT D'ÉTUDE
N° INERIS-DRC-67649-01a

08/11/2005

**Mesure de la bioaccessibilité du plomb pour
l'homme à l'aide de deux tests (IVG et RIVM)
couplée à l'étude de la spéciation.**

INERIS

*maîtriser le risque |
pour un développement durable |*

MESURE DE LA BIOACCESSIBILITÉ DU PLOMB POUR L'HOMME À L'AIDE DE DEUX TESTS (IVG ET RIVM) COUPLÉE À L'ÉTUDE DE LA SPÉCIATION

Client (ministère, industriel, collectivités locales) : Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable

PRÉAMBULE

Le présent rapport a été établi sur la base des informations fournies à l'INERIS, des données (scientifiques ou techniques) disponibles et objectives et de la réglementation en vigueur.

La responsabilité de l'INERIS ne pourra être engagée si les informations qui lui ont été communiquées sont incomplètes ou erronées.

Les avis, recommandations, préconisations ou équivalent qui seraient portés par l'INERIS dans le cadre des prestations qui lui sont confiées, peuvent aider à la prise de décision. Etant donné la mission qui incombe à l'INERIS de par son décret de création, l'INERIS n'intervient pas dans la prise de décision proprement dite. La responsabilité de l'INERIS ne peut donc se substituer à celle du décideur.

Le destinataire utilisera les résultats inclus dans le présent rapport intégralement ou sinon de manière objective. Son utilisation sous forme d'extraits ou de notes de synthèse sera faite sous la seule et entière responsabilité du destinataire. Il en est de même pour toute modification qui y serait apportée.

L'INERIS dégage toute responsabilité pour chaque utilisation du rapport en dehors de la destination de la prestation.

	Rédaction	Vérification	Approbation
NOM	S. Denys / J. Caboche	K. Tack / P. Delalain	J. Bureau
Qualité	Ingénieurs DRC	Ingénieurs DRC	Responsable unité DESP
Visa			

TABLE DES MATIÈRES

1. INTRODUCTION	7
2. BIODISPONIBILITE/BIOACCESSIBILITE	8
2.1 Définitions	8
2.1.1 Biodisponibilité absolue/biodisponibilité relative	8
2.1.2 biodisponibilité orale	8
2.1.3 bioaccessibilité	8
2.2 Pourquoi considérer la biodisponibilité orale des contaminants du sol dans l'évaluation du risque ?.....	9
2.3 Methodes de Quantification de la bioaccessibilité.....	9
2.3.1 Principes généraux.....	9
2.3.2 Description de différents protocoles	11
3. MESURE DE LA SPÉCIATION DES MÉTAUX DANS LES SOLS.....	13
4. MATÉRIELS ET MÉTHODES	13
4.1 LES TERRES ETUDIÉES.....	13
4.1.1 Provenance	13
4.1.2 Caractéristiques physico-chimiques	14
4.2 Mesure de la bioaccessibilité	14
4.2.1 Le choix des tests in vitro	16
4.2.2 synthèse des solutions digestives.....	19
4.2.2.1 test RIVM	19
4.2.2.2 test IVG	19
4.2.3 réalisation des tests.....	19
4.2.3.1 test RIVM (Figure 1a).....	19
4.2.3.2 test IVG (Figure 1 b).....	20
4.2.4 Détermination de la bioaccessibilité	20
4.3 MESURE DE LA SPECIATION.....	20
4.3.1 methodes chimiques (extractions séquentielles)	20
4.3.2 méthodes physiques.....	22
4.3.2.1 Diffractométrie des Rayons X.....	22
4.3.2.2 La Microscopie Electronique à Balayage	22
4.3.2.3 Spectrométrie Infrarouge à Transformée de Fourier	24

4.4 ANALYSES STATISTIQUES.....	24
5. RESULTATS.....	25
5.1 bioaccessibilité du plomb dans les différentes terres	25
5.1.1 Test RIVM.....	25
5.1.2 Test IVG.....	26
5.2 Comparaison des deux tests de bioaccessibilité	26
5.3 Etude de la spéciation du plomb dans les scories.....	27
5.3.1 Evaluation par des methodes chimiques (extraction séquentielle)	27
5.3.2 Evaluation de la spéciation par les methodes physiques.....	27
5.3.2.1 Diffractométrie des rayons X	27
5.3.2.2 Microscope Electronique à Balayage Environnemental.....	31
5.3.2.3 Spectrométrie IRTF	31
5.3.2.3.1 Sur les scories initiales	31
5.3.2.3.2 Sur les residus des tests de mesure de bioaccessibilité.....	32
5.3.2.3.3 Sur les résidus de l'extraction séquentielle.....	33
6. DISCUSSION.....	34
6.1 bioaccessibilité du plomb entre differents echantillons en provenance d'un même site.....	34
6.2 Lien entre bioaccessibilité et speciation	35
7. CONCLUSION.....	36
8. REFERENCES.....	37
LISTE DES ANNEXES.....	38

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principales caractéristiques des compartiments impliqués dans le processus de digestion humaine et effets associés	10
Tableau 2 : Description de différents tests de mesure de la bioaccessibilité.....	12
Tableau 3 : Teneur en plomb des échantillons utilisés dans le cadre de l'étude..	14
Tableau 4: Composition des différentes solutions synthétisées pour le tests de digestion in vitro du RIVM :	15
Tableau 5 : Description des extractions séquentielles.....	21
Tableau 6 : Bioaccessibilité gastrique et intestinale du plomb dans les différentes terres testées obtenue par le test RIVM (les résultats sont exprimés en % de la teneur totale en plomb \pm écart-type).....	25
Tableau 7 : Bioaccessibilité gastrique et intestinale du plomb dans les différentes terres testées et selon le test IVG (les résultats sont exprimés en % de la teneur totale en plomb \pm écart-type)	26
Tableau 8 : Occurrence des éléments en MEBE après les différentes phases de l'extraction séquentielle	30

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Représentation schématique des tests de digestion in vitro du RIVM (4a) et IVG (4b).....	17
Figure 2 : Schéma de principe de la diffractométrie des Rayons X	23
Figure 3 : Schéma de principe du Microscope Electronique à Balayage.....	23
Figure 4 : Fraction de plomb extraite par les différentes phases de l'extraction séquentielle	28
Figure 5 : Diffractogramme des scories à l'état initial	29
Figure 6 : Diffractogramme des scories à l'état initial et après extractions séquentielles	29
Figure 7 : Spectre infrarouge de la cérusite, phase pure.....	32
Figure 8 : Spectre infrarouge des scories avant toute extraction.....	32
Figure 9 Spectre infrarouge de la cérusite (phase pure) et des scories après digestion par le test IVG	33
Figure 10 : Spectre infrarouge de la cérusite (phase pure) et des scories après digestion par le test RIVM	33
Figure 11 : Spectres infrarouges des résidus de scories après les trois premières phase de l'extraction séquentielle	34

1. INTRODUCTION

Les activités industrielles, telles que l'extraction et l'exploitation de minerais, ont généré à long terme, une accumulation de substances toxiques, comme les éléments métalliques (Pb, Cd, As, Sb), dans les sols. L'exposition de l'Homme par les sols peut survenir via un nombre de voies différentes, incluant l'inhalation de poussières, l'absorption cutanée et l'ingestion. L'ingestion de sol est une voie d'exposition significative vis à vis du risque sanitaire, particulièrement chez les enfants du fait des comportements main - bouche lors des activités récréatives (Davids et al., 1996 ; Oomen, 2000 ; Paustenbach 2000).

L'exposition systémique et l'association des effets toxiques des métaux lourds sont gouvernées par la notion de biodisponibilité qui est la fraction de substance présente dans le sol qui atteint la circulation sanguine (Simoneau, 2001). Cependant, dans le contexte actuel français de l'évaluation des risques sanitaires, ce paramètre n'est pas pris en compte. En effet, actuellement, la biodisponibilité des contaminants dans les sols est considérée égale à la biodisponibilité des contaminants dans les matrices utilisés dans les études de toxicité pour l'établissement des Valeurs Toxicologiques de Références (VTR) (Kelley et al, 2002 ; Paustenbach, 2000). Dans ces études, les matrices les plus souvent utilisées sont des matrices alimentaires (ex : du pain pour le chrome) ou aqueuses (eau).

En outre, le risque est calculé sur la base du contenu total en métaux présents dans le sol, ce qui signifie que la valeur par défaut utilisée pour la biodisponibilité orale de l'élément considéré dans les sols est communément de 100% (Davids et al., 1996). Cette approche conservatoire peut avoir des conséquences financières significatives, puisqu'il en résulte une surestimation du risque pour la santé humaine et donc un niveau de décontamination inadapté (Davids et al., 1996, Kelley et al., 2002).

Un paramètre majeur influençant la biodisponibilité est la bioaccessibilité, c'est à dire la fraction de contaminant pouvant être libérée dans le tractus gastro-intestinal. Dans la littérature (Oomen, 2000 , Sips et Eijkeren, 1996), il est suggéré que la bioaccessibilité des contaminants du sol est significativement plus faible que celle des matrices utilisées dans les études de toxicité, et que celle-ci dépend de la forme des métaux (spéciation) et des caractéristiques physico-chimiques du site.

La gestion d'un site contaminé pourrait être réalisée de manière plus pertinente si la mesure de la notion de bioaccessibilité était intégrée aux évaluations du risque. C'est pourquoi, depuis le début des années 1990, les Etats-Unis ainsi que quelques pays Européens, notamment avec la création du groupe de travail BARGE (BioAvailability Research Group Europe) en 2000, travaillent sur le développement de tests in vitro permettant de mesurer la fraction d'un contaminant bioaccessible pour l'Homme. Actuellement, aucun de ces tests n'est normalisé et le groupe BARGE travaille sur la mise en place d'une méthodologie unique en cours de normalisation (Norme ISO/DIS 17924-1, 2005) au niveau international (ISO TC 190 WG 7)

Ce travail a pour objectif de tester deux modèles de mesure de la bioaccessibilité du plomb pour l'homme et de coupler cette mesure avec celle de la spéciation du métal dans les sols utilisant différentes techniques chimiques (extractions séquentielles) ou physiques.

2. BIODISPONIBILITE/BIOACCESSIBILITE

2.1 DÉFINITIONS

Les concepts de biodisponibilité ou bioaccessibilité sont utilisés dans le cadre spécifique de l'ingestion par l'Homme de terre contaminée.

2.1.1 BIODISPONIBILITÉ ABSOLUE/BIODISPONIBILITÉ RELATIVE

Dans le cadre de l'évaluation des risques pour la santé humaine, la biodisponibilité peut être décrite selon deux notions : la biodisponibilité absolue et la biodisponibilité relative (Ruby et al., 1999, Piejnenburg, 1997).

La biodisponibilité absolue est la fraction de composés ingérés, inhalés ou appliqués à la surface de la peau, qui est absorbée et atteint la circulation systémique. La biodisponibilité absolue se définit comme le ratio de la dose absorbée sur la dose administrée (Basta et Gradwohl, 2000 ;Ruby et al., 1996) :

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

La notion de biodisponibilité relative vise à comparer l'absorption d'un composé sous deux spéciations (tel que le carbonate de plomb vs l'acétate de plomb), ou du même composé administré par différents milieux (tels que la nourriture, le sol ou l'eau) (Kelley et al., 2002).

La biodisponibilité relative peut être exprimée comme le ratio de la fraction absorbée du milieu d'exposition, ici le sol, sur la fraction absorbée de ce même contaminant dans la matrice utilisée pour les études de toxicité (Semple et Kieron, 2004).

$$\text{Biodisponibilité relative(\%)} = \frac{\text{Dose absorbée dans le sol}}{\text{Dose absorbée dans le milieu utilisé dans les études de toxicité}} \times 100$$

2.1.2 BIODISPONIBILITÉ ORALE

En pharmacologie, la biodisponibilité orale est définie comme la fraction de la dose administrée oralement et enrichissant la circulation systémique. La fraction biodisponible d'un polluant donné est la résultante de trois mécanismes physiologiques : l'extraction du composé au niveau du système gastro-intestinal par les solutions digestives, l'absorption du composé au travers de l'épithélium et le transport de la fraction non métabolisée du composé vers les organes cibles (Sips et Eijkeren, 1996).

2.1.3 BIOACCESSIBILITE

La fraction bioaccessible d'un contaminant représente la fraction de ce contaminant extraite depuis le sol par les solutions digestives.

La bioaccessibilité contrôle de façon significative la biodisponibilité, c'est pourquoi la plupart des études se réfère à la mesure de ce paramètre.

2.2 POURQUOI CONSIDÉRER LA BIODISPONIBILITÉ ORALE DES CONTAMINANTS DU SOL DANS L'ÉVALUATION DU RISQUE ?

Dans l'évaluation du risque lié à une exposition aux sols contaminés par divers polluants, l'ingestion de sol, notamment pour les enfants, est considérée comme une des voies d'exposition la plus significative (Oomen, 2000 ; Rodriguez et Basta, 1999). La dose d'exposition à une substance donnée, par la voie ingestion, se quantifie à partir de sa teneur totale dans le sol. Les Valeurs Toxicologiques de Référence (VTR), utilisées pour la quantification du risque, sont définies à partir d'études toxicologiques dans lesquelles les contaminants sont administrés sous forme de matrices liquides ou alimentaires. La quantification du risque, qui consiste à comparer la dose d'exposition à la VTR ne prend pas en considération la différence d'accessibilité des polluants entre la matrice à laquelle la cible est exposée (le sol dans le cas présent) et la matrice qui a servi à l'établissement de la VTR. Toutefois, certaines études suggèrent que l'accessibilité des métaux dans le tractus gastro-intestinal est contrôlée par la forme initiale de ces métaux dans le bol alimentaire (Davids et al., 1996, Shroder et al., 2004). Ainsi, dans le cas probable où les spéciations des contaminants des sols sont différentes de celles des matrices utilisées pour l'élaboration des VTR, l'estimation du risque peut être biaisée et les mesures de gestion des sols (excavation par exemple) mises en œuvre sur le site peuvent être largement surestimées au niveau des coûts.

Les méthodes disponibles dans la littérature pour estimer la fraction bioaccessible d'un métal dans un sol sont nombreuses et mettent en jeu des conditions physico-chimiques fortement variables d'une méthode à l'autre. Ci-après sont décrites quelques méthodes disponibles dans la littérature scientifique.

2.3 METHODES DE QUANTIFICATION DE LA BIOACCESSIBILITÉ

L'étape de bioaccessibilité est considérée comme la plus sensible pour la caractérisation de la biodisponibilité orale (Oomen et al., 2002). Les protocoles permettant de mesurer la bioaccessibilité ont notamment été développés dans le cadre d'études pharmaceutiques, nutritionnelles ou encore dans le cadre d'études relatives à la libération de contaminants en provenance de jouets (Oomen et al., 2003).

2.3.1 PRINCIPES GÉNÉRAUX

Les méthodes de mesure de la bioaccessibilité visent à simuler partiellement les mécanismes physiologiques de la digestion humaine et notamment les réactions physico-chimiques mises en jeu au niveau du système gastro-intestinal. Les mécanismes mis en jeu lors du passage de l'échantillon de sol contaminé dans le tractus gastro-intestinal sont rappelés ci-après (Tableau 1).

Tableau 1 : Principales caractéristiques des compartiments impliqués dans le processus de digestion humaine et effets associés

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

A l'heure actuelle, les réactions microbiennes prenant place au niveau de l'intestin ne sont pas considérées dans ces tests (Freeman et al., 1996). Ainsi, en d'autres termes, les tests mis en œuvre consistent en des extractions mettant en jeu des conditions physico-chimiques et des réactifs visant à simuler au mieux l'environnement gastro-intestinal humain.

En théorie, un test de bioaccessibilité, pour être pertinent, doit être corrélé à des mesures de biodisponibilité (réalisées in vivo), ce qui n'est pas le cas de la majorité des tests actuellement décrits dans la littérature scientifique.

2.3.2 DESCRIPTION DE DIFFÉRENTS PROTOCOLES

Les tests permettant la mesure de la bioaccessibilité des contaminants des sols ont été développés depuis le début des années 1990, principalement par des équipes nord-américaines ou européennes, fédérées au sein du groupe de travail « BARGE ». Différents tests décrits dans la littérature sont reportés ci-dessous (Tableau 2).

Certains de ces tests ont été corrélés à des tests sur animaux (mesure de la biodisponibilité), d'autres non. Par exemple, le test IVG développé par Rodriguez et Basta en 1999 a été validé par rapport à des données in vivo obtenues chez le porc pour le plomb, le cadmium et l'arsenic (Rodriguez et Basta, 1999 ; Schroder et al., 2004).

Le tableau 2 regroupe les caractéristiques de chaque compartiment impliqué dans le phénomène de digestion. La prise en compte ou non d'un de ces compartiments, dans les protocoles expérimentaux pour mesurer la bioaccessibilité, peut en affecter la mesure (Davids et al., 1996 ; Oomen et al., 2002). Par exemple, l'arsenic qui est anionique et le plomb qui est cationique, peuvent avoir un comportement différent lors de l'extraction de la matrice sol à différents pH (8).

Les mécanismes de digestion humaine, mettant en jeu des phénomènes chimiques et biologiques, auront pour effet potentiel de modifier les liaisons entre le contaminant considéré et la matrice et pourront ainsi rendre les métaux disponibles pour l'absorption gastro-intestinale. Cependant, pour la matrice sol, différents mécanismes de fixation entre les constituants du sol et les métaux peuvent être mis en place et ainsi avoir un impact sur la bioaccessibilité.

Ainsi, dans le cadre de ce travail nous nous sommes également intéressés à la mesure de la spéciation de l'élément considéré dans le sol afin de tenter de la coupler avec la mesure de la bioaccessibilité. Ci-après sont rappelés quelques notions relatives à la mesure de la spéciation des éléments inorganiques dans les sols.

Tableau 2 : Description de différents tests de mesure de la bioaccessibilité

Méthodes	Type	Compartiments simulés	pH	T (°C)	Nourriture	Ratio L/S ^(a)	Temps résidence	Métaux testés	Statut de validation ^(b)
PBET	Batch	Estomac	2,5	37	non	100/1	1 H	As, Pb	V/ porc, singe (As, Pb)
		Petit intestin	7	37	non	100/1	4H		
SBET	Batch	Estomac	1,5	37	non	100/1	1H	As, Cd, Pb	V/porc (Pb)
IVG	Batch	Estomac	1,8	37	oui	150/1	1H	As	V/porc (As)
		Petit intestin	5,5	37	oui	150/1	1H		
US P	Batch	Estomac	1	37	non	1000/1	2H	Pb, Cr, As, Cd, Ni	NV
MB & SR	Batch	Cavité orale	6,4	37	non	160/1	5 s	Pb, Cr, As, Cd	C/humain (Pb)
		Estomac	2	37	non	2160/1	2H		
		Petit intestin	7,5	37	non	4770/1	4H		
DIN	Batch	Cavité orale	6,4	37	oui	15/1	0,5 H	As, Cd, Pb, Cr, Hg	V/ porc (non publié) C
		Estomac	2	37	oui	50/1	2 H		
		Petit intestin	7,5	37	oui	100/1	6H		
SHIME	Batch	Estomac	5,2	37	oui	2,5/1	3 H	As, Cd, Pb	C
		Petit intestin	6,5	37	oui	4/1	5 H		
RIVM	Batch	Cavité orale	6,5	37	non	15/1	5 min	As, Cd, Pb	C
		Estomac	1,5	37	non	37,5/1	2 H		
		Petit intestin	5,5	37	non	97,5/1	2H		
TIM	Dynamique	Cavité orale	5	37	non	5/1	5 min	As, Cd, Pb	C
		Estomac	2	37	non	30/1	1,5 H		
		Petit intestin	7	37	non	51/1	6 H		
AOAC	Batch	Estomac	1,12	37	non	150/1	16 H	Cu, Zn, Mn, Fe, Al	NV

(a) : ratio liquide/solide utilisé dans les extractions

(b) 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 humain).

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

3. MESURE DE LA SPÉCIATION DES MÉTAUX DANS LES SOLS

La majorité des études relatives à la caractérisation de la spéciation des métaux dans les sols a privilégié des techniques indirectes telles que les extractions chimiques sélectives ou séquentielles pour accéder à la forme chimique des éléments (Sposito, 1989). Dans son principe, la spéciation chimique des métaux traces des sols repose sur l'utilisation, classique en science du sol, de réactifs chimiques qui, selon leurs propriétés, extraient une partie plus ou moins importante de métaux traces d'un échantillon. Dans une première approche, la mesure des métaux dans les différentes fractions permet la classification des métaux par compartiment (Bataillard, 2002). Cependant, cette classification souffre généralement du manque de sélectivité des extractants utilisés (Rendell et al., 1980). De plus, cette approche ne donne pas directement accès aux mécanismes cristallographiques du piégeage des métaux.

Les méthodes physiques, telles que la diffraction par rayons X ou le synchrotron, permettent la détermination directe de la spéciation des métaux lourds dans les sols. Cependant, ces méthodes physiques sont limitées par leurs seuils de détection élevés. D'autres techniques microscopiques, comme le Microscope Electronique à Balayage (MEB), permettent d'observer les éléments à l'échelle du micromètre. Même si elles ne permettent pas la détermination de la spéciation elles sont utilisées en science du sol pour caractériser la structure des matériaux et analyser la nature et l'organisation des constituants (Tessier et al., 1979). En effet, la détermination des rôles respectifs des constituants organiques et minéraux est, en particulier, de toute première importance pour comprendre les processus qui contrôlent la mobilité, la biodisponibilité et la toxicité des métaux lourds dans les sols.

4. MATÉRIELS ET MÉTHODES

4.1 LES TERRES ETUDIÉES

4.1.1 PROVENANCE

Les sols échantillonnés pour mener l'étude sont issus d'un site fortement pollué en métaux lourds (Pb, Cd) et métalloïdes (As, Sb) qui a été le siège d'activités minières. L'échantillonnage des sols a consisté en un prélèvement, dans la zone de 0 à 5 cm de profondeur, de quatre à cinq échantillons ponctuels par parcelle échantillonnée. Ces échantillons ponctuels ont été mélangés de façon à obtenir un échantillon moyen représentatif de la parcelle. Dans le cadre de l'étude, quatre sols ont été échantillonnés :

- Un sol prélevé dans un jardin potager (« Jardin (1) ») ;
- Un sol prélevé dans un jardin d'agrément (« Jardin (2) ») ;
- Un échantillon de scorie échantillonné sur un sentier pédestre (« scorie ») ;
- Un échantillon de surface prélevé sur un sol végétalisé développé sur la roche métallifère exploitée (« Fond géochimique »).

En plus de ces échantillons, deux terres de référence acquises auprès du NIST (National Institute Standard of Technology américain) sont également utilisées pour contrôler la validité des mesures analytiques réalisées dans le cadre du travail

Les échantillons de sol sont broyés afin d'obtenir une granulométrie inférieure à 250 µm qui correspond à la fraction la mieux retenue par l'épiderme (Norme ISO/DIS 17924-1, 2005).

Les terre sont ensuite séchées à l'étuve à une température de 40°C.

4.1.2 CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES

Les propriétés physico-chimiques des échantillons sont regroupées dans le tableau 3. Les concentrations totales en plomb ont été déterminées par digestion acide des sols au four à micro-ondes CEM MARS X500 selon la norme NF X33-010. Les minéralisats ont ensuite été analysés par ICP-OES. Ces concentrations sont présentées ci-dessous (Tableau 3).

	[Pb] mg/kg
Réf SMR 2710	5532
Réf SMR 2711	1162
Jardin (1)	4767
Jardin (2)	2141
Scorie	77007
Fond géochimique	2347

Tableau 3 : Teneur en plomb des échantillons utilisés dans le cadre de l'étude

4.2 MESURE DE LA BIOACCESSIBILITÉ

Deux protocoles de mesure de la bioaccessibilité ont été sélectionnés pour mener à bien les objectifs de l'étude : le test du RIVM et le test IVG. Afin de tester la pertinence de nos mesures analytiques, nous avons également choisi de réaliser les tests de mesure de bioaccessibilité sur les matériaux de référence décrits ci-avant, par comparaison avec les résultats de la littérature pour ces mêmes échantillons.

Tableau 4: Composition des différentes solutions synthétisées pour le tests de digestion in vitro du RIVM :

	SOLUTION SALIVAIRE	SOLUTION DE JUS GASTRIQUE	SOLUTION DE JUS DUODENUM	SOLUTION DE BILE
SOLUTION INORGANIQUE	10 ml KCl 89,6 g/l 10 ml KSCN 20 g/l 10 ml NaH ₂ PO ₄ 88,8 g/l 1,7 ml NaCl 175,3 g/l 1,8 ml NaOH 40 g/l	15,7 ml NaCl 175,3 g/l 3,0 ml NaH ₂ PO ₄ 88,8 g/l 9,2 ml KCl 89,6 g/l 18 ml CaCl ₂ , 2 H ₂ O 22,2 g/l 10 ml NH ₄ Cl 30,6 g/l 8.3 ml HCl 37% g/g	40 ml NaCl 175,3 g/l 40 ml NaHCO ₃ 84,7 g/l 10 ml KH ₂ PO ₄ 8g/l 6,3 ml KCl 89,6 g/l 10 ml MgCl ₂ 5g/l 180 µl HCl 37% g/g	30 ml NaCl 175,3 g/l 68,3 ml NaHCO ₃ 84,7 g/l 4,2 ml KCl 89,6 g/l 200 µl HCl 37% g/g
SOLUTION ORGANIQUE	8 ml d'urée 25 g/l	10 ml de glucose 65 g/l 10 ml d'acide glucuronique 2 g/l 3,4 ml d'urée 25 g/l 10 ml glucosamine hydrochloride 33 g/l	4 ml d'urée 25 g/l	10 ml d'urée 25 g/l
AJOUT AUX SOLUTIONS INORGANIQUE ET ORGANIQUE	145 mg α-amylase 15 mg d'acide urique 50 mg de mucine	1 g de Sérum albumine bovin 1 g de pepsine 3 g de mucine	9 ml CaCl ₂ , 2 H ₂ O 22,2 g/l 1 g sérum albumine bovin 3 g pancréatine 0,5 g de lipase	10 ml CaCl ₂ , 2 H ₂ O 22,2 g/l 1,8 g sérum albumine bovin 6 g d'extrait de bile de porcine

En outre, la conduite des tests de mesure de bioaccessibilité sur ces deux échantillons permettront de comparer nos résultats avec ceux publiés dans la littérature sur les mêmes échantillons de sol.

4.2.1 LE CHOIX DES TESTS IN VITRO

Comme nous l'avons vu dans la synthèse bibliographique, actuellement il n'y a pas de méthode standardisée permettant d'estimer la bioaccessibilité à l'aide de tests de digestion in vitro. Plusieurs modèles existent avec différentes conditions expérimentales. Dans le cadre de l'étude nous avons décidé de comparer et d'interpréter les valeurs de bioaccessibilité de deux modèles :

- le modèle développé par le RIVM (Oomen, 2000) ;
- le modèle de digestion In Vitro Gastrointestinal (IVG) (Rodriguez et Basta, 1999).

Les critères suivants ont été déterminés pour la sélection des deux tests :

- La simplicité du test ;
- La reproductibilité à partir de conditions expérimentales identiques, le résultat obtenu entre deux laboratoires différents pour l'échantillon testé doit être similaire ;
- La corrélation des résultats obtenus par le test à des données de biodisponibilité ou à d'autres tests de digestion in vitro. C'est le cas pour les deux tests choisis. En effet, les résultats obtenus par le test IVG sont corrélés aux valeurs de biodisponibilité in vivo chez le porc pour l'arsenic et le cadmium. Concernant le modèle RIVM, les résultats ne sont pas corrélés aux valeurs de biodisponibilité in vivo, mais il est testé dans le cadre de l'intercomparaison des tests de digestion gastrique in vitro menée par le groupe BARGE.

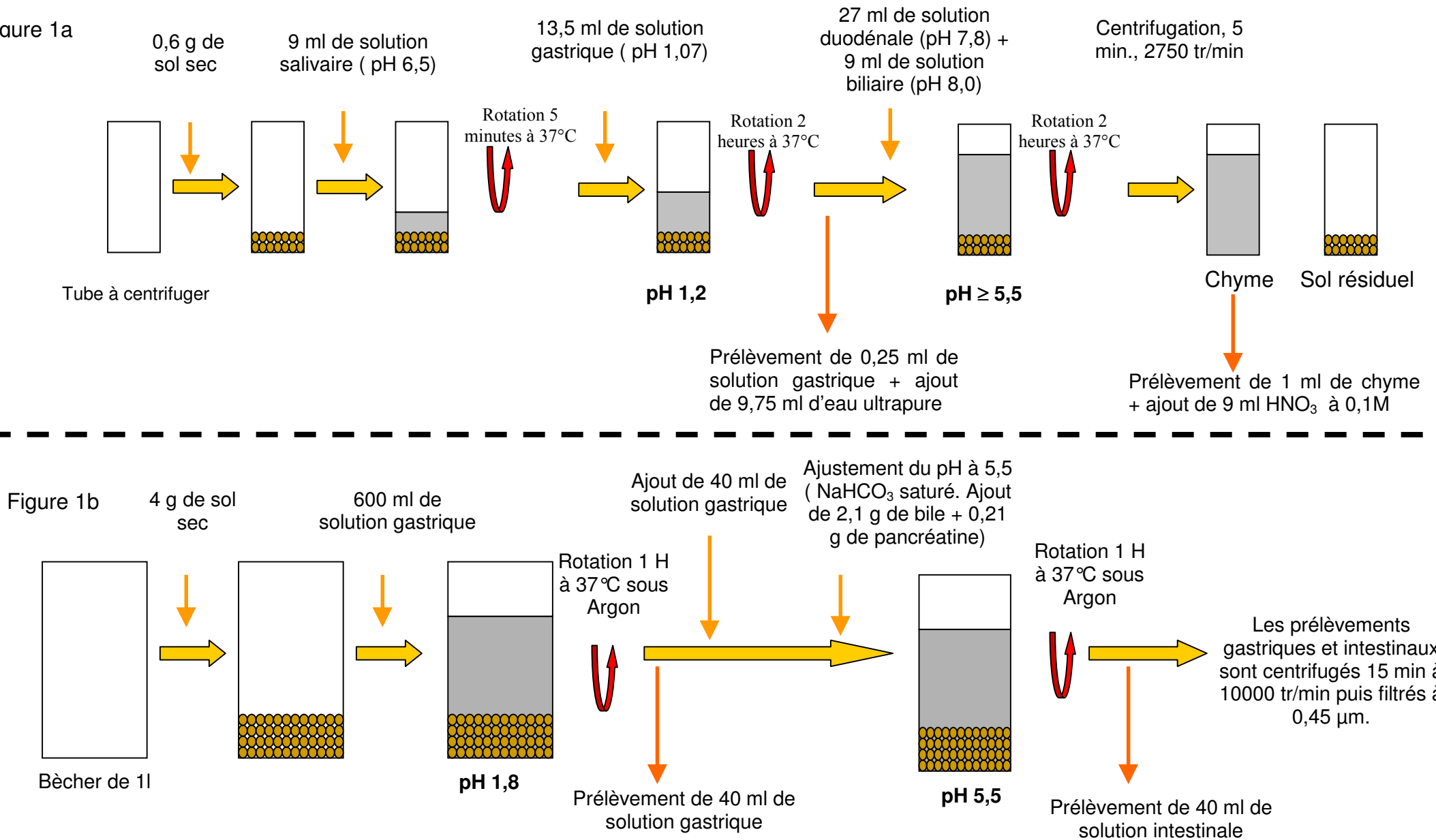


Figure 1 Représentation schématique des tests de digestion in vitro du RIVM (4a) et IVG (4b)

4.2.2 SYNTHÈSE DES SOLUTIONS DIGESTIVES

4.2.2.1 TEST RIVM

Une solution inorganique et une solution organique sont préparées pour la salive, le jus gastrique, le jus duodénale et la bile (Tableau 4). Chaque solution est complétée à 500 ml avec de l'eau ultrapure. A la suite de cela, les solutions organiques et inorganiques de chaque jus digestif synthétique sont mélangées et plusieurs constituants sont ajoutés et dissous (Tableau 4). Si nécessaire, le pH des solutions digestives est ajusté aux valeurs fixées, soit par ajout d'acide chlorhydrique (37% g/g) ou à l'aide d'une solution d'hydrogénocarbonate de sodium saturé. La préparation des solutions digestives se fait la veille du lancement du test. Les solutions sont agitées et placées à 37°C pendant toute la nuit.

4.2.2.2 TEST IVG

La solution gastrique se compose de 0,15 M de NaCl et de 1% en masse de pepsine de porcine. La solution est ajustée au pH 1,8 à l'aide d'acide chlorhydrique. Pour la solution intestinale, une solution saturée d'hydrogénocarbonate est ajoutée à la solution précédente pour obtenir un pH de 5,5. Puis, on ajoute 2,1 g d'extrait de bile de porcine et 0,21 g de pancréatine de porcine. La préparation des solutions étant plus simple et plus rapide, elles sont préparées le jour même du test. Cependant, elles sont mises à agiter à 37°C afin de s'assurer que tous les réactifs soient dissous.

4.2.3 RÉALISATION DES TESTS

4.2.3.1 TEST RIVM (FIGURE 1A)

La totalité des manipulations se déroule à 37°C. Pour cela, l'agitateur rotateur est placé dans une étuve ventilée thermostatée à 37°C et contrôlée par un thermocouple. Le test de digestion commence par l'introduction de 9 mL de solution salivaire à 0,6 g de sol sec à un pH de 6,5. Le mélange est mis en rotation pendant 5 minutes. Ensuite, on ajoute 13,5 ml de solution gastrique à un pH de 1,07. Le pH du mélange est contrôlé et fixé à 1,2 à l'aide d'acide chlorhydrique (37% g/g). Le mélange est de nouveau mis en rotation pour une durée de deux heures. Une fois la phase gastrique terminée, on contrôle le pH du mélange afin d'observer les variations de celui-ci durant la manipulation. Puis, on prélève 0,25 ml de chaque échantillon afin de déterminer la bioaccessibilité gastrique du plomb dans les échantillons de sol testés. Les solutions duodénales (pH 7,8) et biliaires (pH 8,0) sont ensuite ajoutées dans les proportions respectives de 27 ml et 9 ml. Le pH du mélange est fixé entre 5,5 et 6 à l'aide d'une solution d'hydrogénocarbonate de sodium saturée. Les échantillons sont de nouveau mis en rotation pendant deux heures. A la fin des deux heures, le pH du mélange est de nouveau contrôlé. Finalement, les échantillons sont centrifugés pendant 5 minutes à 3000 g. Le surnageant, c'est-à-dire le chyme, est récupéré afin de déterminer la bioaccessibilité intestinale du plomb dans le chyme. Pour cela on procède à une dilution du chyme par de l'acide nitrique à 0,1M (1/10).

4.2.3.2 TEST IVG (FIGURE 1 B)

La méthode in vitro est conduite en utilisant un récipient de 1L plongé dans un bain d'eau à une température de 37°C agité horizontalement à une vitesse de 100 tr/min afin de maintenir l'homogénéité du mélange. 4 g de sol sont placés dans 600 ml de solution gastrique, soit un ratio solide/liquide de 1/150. Le pH de la solution est continuellement contrôlé et ajusté à 1,8 durant la durée de l'expérience. Les conditions anaérobies sont maintenues par un bullage constant d'argon au travers la solution. Après 1 heure, 40 ml de la solution gastrique sont échantillonnés pour l'analyse du plomb. Afin de maintenir le ratio solide/liquide constant on ajoute 40 ml de solution gastrique fraîche dans le mélange. Suite à cela, la solution d'extraction est modifiée pour simuler la solution intestinale par ajout de solution NaHCO₃ saturée pour ajuster le pH à 5,5, suivi de l'addition de 2,10 g d'extrait de bile de porc et 0,21 g de pancréatine de porc. Une faible quantité d'agent anti-mousse (décanol) est ajoutée dans chaque réacteur. De la même manière, après 1 heure, 40 ml de la solution intestinale sont collectés pour l'analyse du plomb. Les échantillons de solutions gastriques et intestinales sont centrifugés (10000 tr/min) pendant 15 minutes et filtrés à 0,45 µm (filtre seringue en acétate de cellulose) puis le filtrat est acidifié par de l'acide chlorhydrique afin de déterminer la concentration en plomb dans chacune des phases.

4.2.4 DÉTERMINATION DE LA BIOACCESSIBILITÉ

Les échantillons sont analysés par ICP-OES afin de déterminer les concentrations en métaux présents dans les différentes phases. La détermination de la bioaccessibilité gastrique et intestinale est faite selon l'équation ci-dessous :

$$\text{Bioaccessibilité (\%)} = \frac{\text{concentration en mg / kg extrait lors du test in vitro}}{\text{concentration totale en mg / kg}} * 100$$

4.3 MESURE DE LA SPECIATION

4.3.1 METHODES CHIMIQUES (EXTRACTIONS SÉQUENTIELLES)

L'objectif de ces manipulations est de caractériser le type d'association entre le plomb et les constituants du sol. De nombreux protocoles d'extraction séquentielle ont été proposés depuis une vingtaine d'années. Pour l'étude, nous utiliserons un protocole développé par l'INERIS pour les résidus miniers basé sur le protocole de Tessier (Brunel, 2005) (Tableau 5). Il faut noter qu'entre chaque phase la solution d'extraction est filtrée afin de récupérer le résidu. Celui-ci est lavé deux fois avec 10 ml d'eau ultrapure puis mis à sécher à 37 °C avant de subir la phase suivante de l'extraction. Toutes les extractions sont réalisées en triplicats et incluent un blanc.

Tableau 5 : Description des extractions séquentielles

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

4.3.2 MÉTHODES PHYSIQUES

Comme nous l'avons mentionné dans le paragraphe ci-dessus, les extractions chimiques permettent une caractérisation globale de la distribution des métaux dans un échantillon solide. Afin d'affiner ces résultats, nous avons examiné des échantillons de sol par Diffractométrie des Rayons X (DRX), Microscopie électronique à Balayage couplée à la microanalyse X et par spectrométrie Infra Rouge à Transformée de Fourier. L'association de ces différentes techniques analytiques complémentaires permet d'identifier plus précisément les phases solides présentes dans le sol et dans certains cas de spécier certains métaux lourds comme le plomb ou le zinc. Si les techniques d'analyse physique ont l'avantage de pouvoir étudier un échantillon quasiment sans préparation ni traitement chimique, elles ont en général l'inconvénient d'avoir des limites de détection et de quantification bien supérieures à celles obtenues par ICP-AES ou ICP-MS. C'est pour cette raison, que le sol représentant les « scories » à fortes teneurs en métaux a été choisi comme l'échantillon à étudier.

4.3.2.1 DIFFRACTOMÉTRIE DES RAYONS X

Un tube produit des rayons X par collision entre les électrons émis par un filament et une cible (anode de cuivre) (Figure 2). Lorsque les conditions de la loi de Bragg ($n\lambda = 2.d.\sin\theta$) sont réunies, les rayons X diffractés par l'échantillon sont détectés par un compteur proportionnel à gaz. Un diffractogramme est donc représenté par un nombre de coups par seconde en fonction de l'angle 2θ et est caractéristique d'une structure cristalline donnée.

Cette technique permet donc l'identification de phases cristallines dans un mélange complexe. La DRX est la seule méthode à notre disposition capable dans certains cas de nous permettre de déterminer la spéciation des métaux lourds ou des métalloïdes présents dans les phases solides cristallines. Pour cela, on analyse environ 1 g de poudre sèche et de fine granulométrie. L'analyse s'effectue à un balayage très lent, durant 16 heures, afin d'acquérir un diffractogramme avec rapport signal/bruit optimal.

4.3.2.2 LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE À BALAYAGE

Le canon à électrons (Figure 3, schéma d'un MEB classique), se trouve en tête de la colonne du microscope et est constitué principalement d'un wehnelt polarisé positivement et d'un filament de tungstène. Lorsque le filament est chauffé, il émet des électrons qui sont ensuite accélérés par la haute tension créée entre le filament et l'anode. Le faisceau d'électrons est focalisé en une fine sonde par un ensemble de lentilles électromagnétiques. Le balayage de la surface de l'échantillon suivant une trame rectangulaire est assuré par des bobines de déflexion. Il y a synchronisation entre le balayage de l'échantillon et celui de l'écran. Lorsque le faisceau d'électrons primaires rentre en contact avec l'échantillon, il se produit un phénomène d'interaction

Figure 2 : Schéma de principe de la diffractométrie des Rayons X

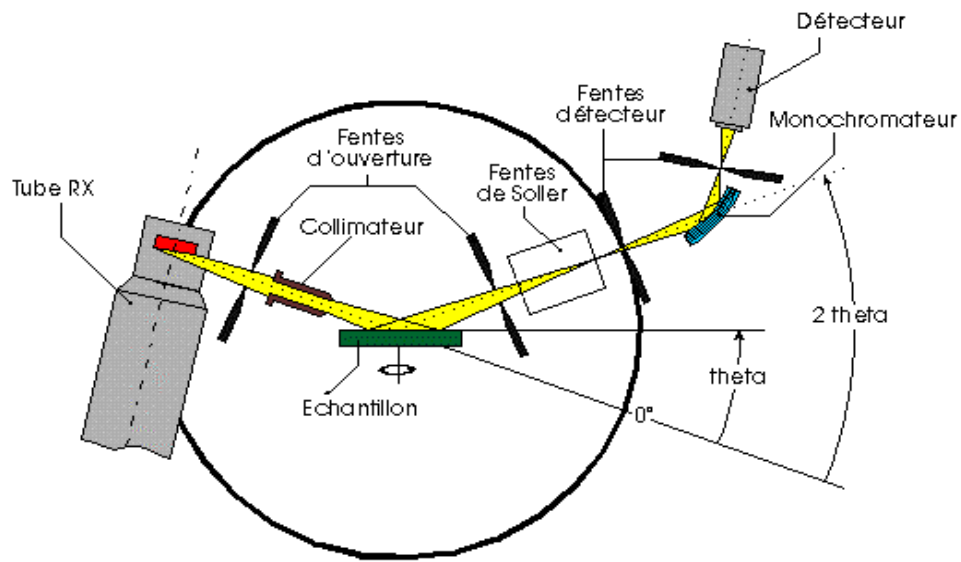
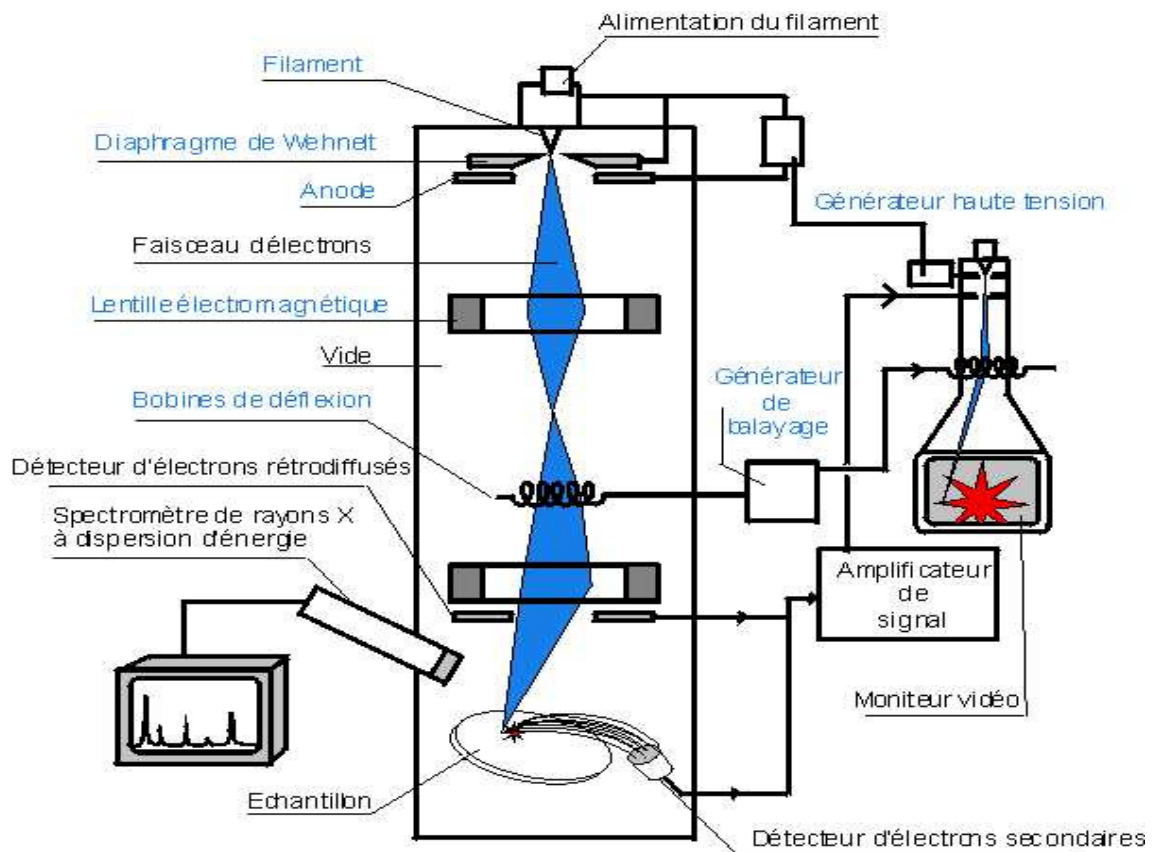


Figure 3 : Schéma de principe du Microscope Electronique à Balayage.



électrons / matière. Les électrons secondaires ou rétrodiffusés qui sont générés à la surface de l'échantillon, sont collectés par des détecteurs spécifiques, convertis en un signal électrique qui est amplifié et utilisé pour moduler la brillance de l'écran de l'ordinateur. Il y a donc une relation entre la brillance d'un pixel de l'image sur l'écran et le nombre d'électrons secondaires ou rétrodiffusés émis en un point de l'échantillon.

Les électrons secondaires générés à faible profondeur (1 à 10 nm) sont utilisés pour créer des images topographiques, les électrons rétrodiffusés provenant d'une plus « grande » profondeur servent à créer des images chimiques très utilisées dans la recherche de métaux lourds ou de métalloïdes dans les sols. Les particules contenant notamment des métaux lourds sont détectées par imagerie chimique puis analysées par microanalyse X afin de déterminer leur composition chimique élémentaire qualitative (B < Z < U). Ce « screening minéral particulaire » permet de visualiser plus finement les associations de métaux lourds ou de métalloïdes, mais ne permet pas réellement d'obtenir de véritables informations sur la spéciation de tel ou tel élément chimique. Bien que de type environnemental (Environmental Scanning Electron Microscopy), les analyses de sols ont été effectuées en mode semi-environnemental simplement pour éviter de métalliser les échantillons à l'or ou au carbone.

4.3.2.3 SPECTROMÉTRIE INFRAROUGE À TRANSFORMÉE DE FOURIER

Cette technique de spectroscopie moléculaire apporte de précieuses informations sur les fonctions chimiques de composés organiques, inorganiques ou minéraux. Dans cette étude elle a également été utilisée, non seulement pour visualiser les variations de concentration en PbCO_3 dans les différentes extractions chimiques, mais aussi pour évaluer semi-quantitativement la part du plomb qui se trouve sous forme d'un carbonate spécifique (cérusite).

4.4 ANALYSES STATISTIQUES

Les résultats seront présentés sous forme de moyennes associées aux écart-types. Ainsi, des comparaisons entre les différentes moyennes obtenues, pour un critère donné, pourront être comparées entre elles. Dans le cas où le nombre d'échantillon est supérieur à 2 le test de l'ANOVA sera utilisé. Pour cela, le logiciel de statistique STATBOXPRO 6.0 a été utilisé.

Les groupes homogènes selon le test de Newmann-Keuls sont identifiés par des lettres dans les figures correspondantes. En plus de l'analyse de variance, des tests de corrélation (coefficient de Spearman et Pearson, régression linéaire) seront utilisés afin de mettre en évidence des relations éventuelles entre les phases d'extractions séquentielles et les tests de bioaccessibilité.

5. RESULTATS

5.1 BIOACCESSIBILITÉ DU PLOMB DANS LES DIFFÉRENTES TERRES

5.1.1 TEST RIVM

Les fractions de plomb bioaccessible obtenues dans les différents échantillons de sols et obtenue selon le test RIVM (n=9) sont regroupées ci-dessous (Tableau 6).

		SMR 2710	SMR 2711	Jardin (1)	Jardin (2)	Scorie	Fond géochimique
Bioaccessibilité	Phase gastrique	79 ± 4 (b)	85 ± 5 (a)	56 ± 7 (c)	15 ± 3 (f)	50 ± 7 (d)	21 ± 4 (e)
	Phase intestinale	25 ± 1 (a)	13 ± 1 (b)	25 ± 3 (a)	5 ± 1 (d)	15 ± 2 (b)	9 ± 2 (c)

Les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Neuwmann-Keuls, $\alpha = 5\%$)

Tableau 6 : Bioaccessibilité gastrique et intestinale du plomb dans les différentes terres testées obtenue par le test RIVM (les résultats sont exprimés en % de la teneur totale en plomb ± écart-type)

La pertinence des mesures est démontrée par l'absence de différence significative ($\alpha = 5\%$) entre les mesures réalisées dans le cadre de l'étude sur les deux échantillons de référence et les valeurs publiées pour ces mêmes échantillons (non décrit ici).

Pour les différents types de terre, les valeurs de bioaccessibilité obtenues pour la phase gastrique sont significativement supérieures aux valeurs obtenues pour la phase intestinale. Pour la phase gastrique, la bioaccessibilité varie entre 21% pour le fond géochimique et 85% pour le sol de référence SMR 2711. Pour la phase intestinale, des valeurs significativement plus faibles sont observées et varient entre 5% pour le jardin (2) et 28% pour le sol de référence SMR 2710.

5.1.2 TEST IVG

Les fractions de plomb bioaccessible obtenues dans les différents échantillons de sols et obtenue selon le test IVG (n=5) sont regroupées ci-dessous (Tableau 7).

		SMR 2710	SMR 2711	Jardin (1)	Jardin (2)	Scorie	Fond géochimique
Bioaccessibilité	phase gastrique	67 ± 5 (a)	55 ± 2 (bc)	56 ± 6 (bc)	59 ± 7 (b)	73 ± 4 (a)	49 ± 7 (c)
	phase intestinale	3 ± 1 (c)	8 ± 0,1 (a)	8 ± 1 (a)	2 ± 2 (c)	3 ± 1 (c)	6 ± 1 (b)

Les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Neumann-Keuls, $\alpha = 5\%$)

Tableau 7 : Bioaccessibilité gastrique et intestinale du plomb dans les différentes terres testées et selon le test IVG (les résultats sont exprimés en % de la teneur totale en plomb ± écart-type)

Comme pour le test RIVM, la pertinence des mesures est démontrée par l'absence de différence significative ($\alpha = 5\%$) entre les mesures réalisées dans le cadre de l'étude sur les deux échantillons de référence et les valeurs publiées pour ces mêmes échantillons et obtenues par le test IVG.

Les valeurs de bioaccessibilité du plomb dans la phase gastrique sont plus élevées que celles de la phase intestinale. Concernant la phase gastrique, la fraction de plomb bioaccessible varie entre 49 % pour le sol représentatif du fond géochimique et 73% pour les scories. Pour la phase intestinale, ces fractions varient entre 3% pour l'échantillon de référence et 8 % pour le sol de jardin (1) ou l'échantillon de référence SMR 2711.

5.2 COMPARAISON DES DEUX TESTS DE BIOACCESSIBILITÉ

Pour chaque terre, les valeurs obtenues pour les deux tests montrent des différences significatives ($\alpha = 5\%$), exception faite de l'échantillon « jardin (1) ». Il est en outre difficile de dégager une tendance nette de cette comparaison, les valeurs les plus élevées étant obtenues indifféremment pour l'un ou l'autre des deux tests.

5.3 ETUDE DE LA SPÉCIATION DU PLOMB DANS LES SCORIES

Il est probable qu'un des facteurs affectant la bioaccessibilité du plomb dans les sols est la nature des liaisons qui existent entre cet élément et les phases minérales ou organiques des sols. C'est pourquoi, ci-après est étudiée la spéciation du plomb. Pour des raisons de limites de détection des méthodes physiques employées, seuls les résultats relatifs aux scories sont présentés dans ce travail. A l'inverse des autres terres, les niveaux de contamination de ces matériaux sont en effet suffisamment élevés pour permettre l'analyse des scories par les divers outils sélectionnés pour l'étude (DRX, MEBE et IRTF).

5.3.1 EVALUATION PAR DES METHODES CHIMIQUES (EXTRACTION SÉQUENTIELLE)

Le plomb est diversement réparti entre les différentes fractions de l'extraction séquentielle. La majorité du plomb est présent dans la fraction associée aux sulfures (environ 50 % de la teneur totale en plomb des scories, Figure 4). La seconde fraction, en quantité, est la fraction résiduelle, qui représente environ 23 % du plomb total. La fraction associée aux carbonates représente environ 20% de la teneur en plomb total. Les fractions solubles et facilement échangeables ne représentent que 0,13% du plomb total.

5.3.2 EVALUATION DE LA SPÉCIATION PAR LES METHODES PHYSIQUES

Par rapport aux méthodes chimiques, les méthodes physiques ont l'avantage de révéler la nature précise des liaisons entre l'élément et les différentes phases porteuses de l'échantillon analysé. Elles sont donc quantitatives à la différence des extractions séquentielles.

5.3.2.1 DIFFRACTOMÉTRIE DES RAYONS X

Le diffractogramme des scories initiales est représenté ci-dessous (Figure 5). Les raies de diffraction spécifiques de la cérusite (PbCO_3) et de la smithsonite (ZnCO_3) ont été détectées. D'autre part, on trouve également des formes terrigènes comme le quartz ou la dolomite. Cette analyse montre qu'une partie du plomb présent dans les scories est associée aux carbonates.

Les résidus d'extractions séquentielles ont également fait l'objet d'analyse par diffractométrie (Figure 6). Pour les diffractogrammes des deux premières phases d'extraction séquentielle, les raies caractéristiques de la cérusite sont toujours visibles, alors que sur celui des scories ayant subi la troisième phase d'extraction séquentielle les raies caractéristiques ont, à la limite de détection près, disparues. La quasi totalité de la cérusite est extraite lors de la seconde phase. Ces observations corroborent les résultats chimiques d'extractions séquentielles (cf section 5.3.1).

Figure 4 : Fraction de plomb extraite par les différentes phases de l'extraction séquentielle

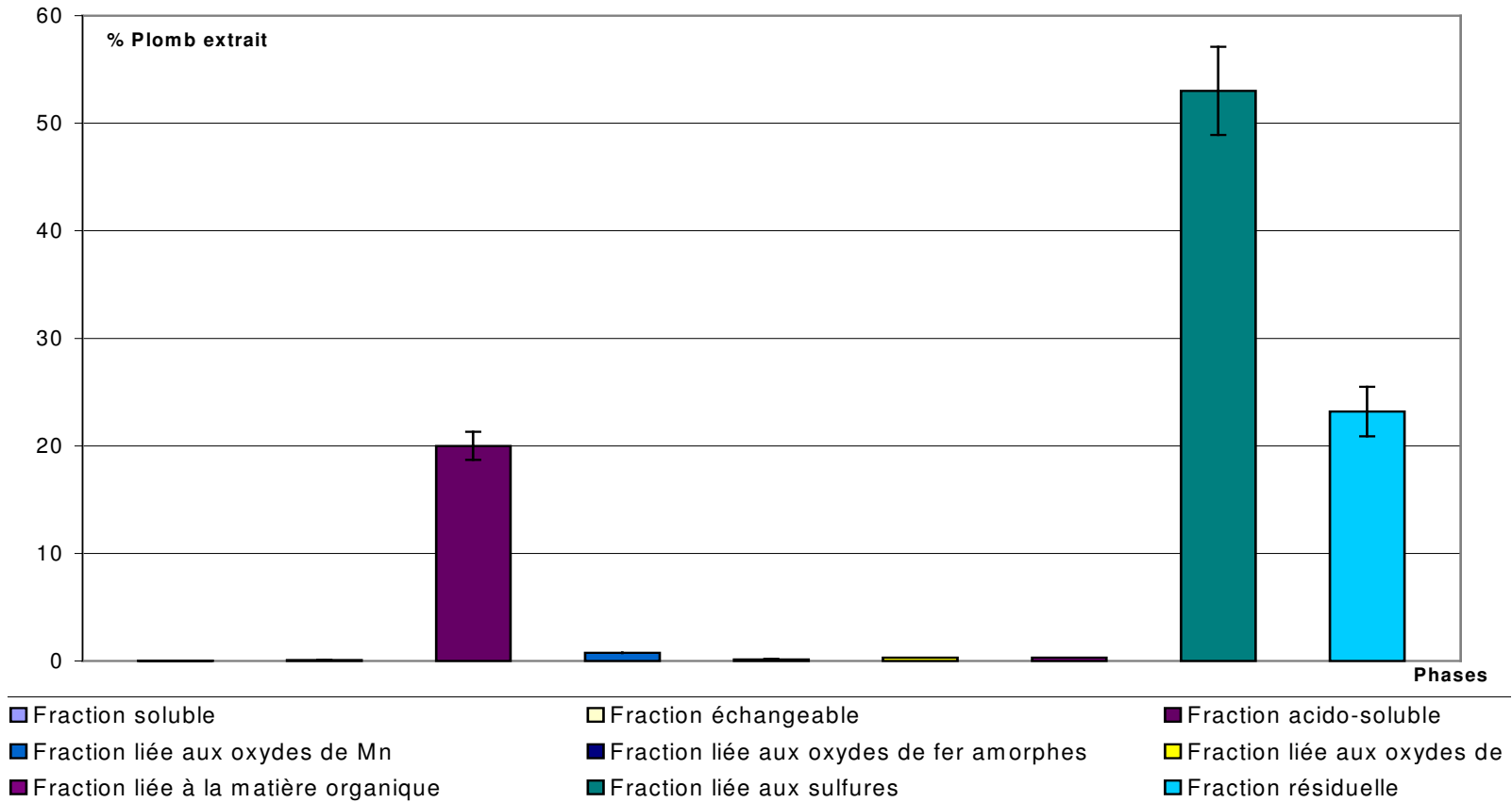


Figure 5 : Diffractogramme des scories à l'état initial

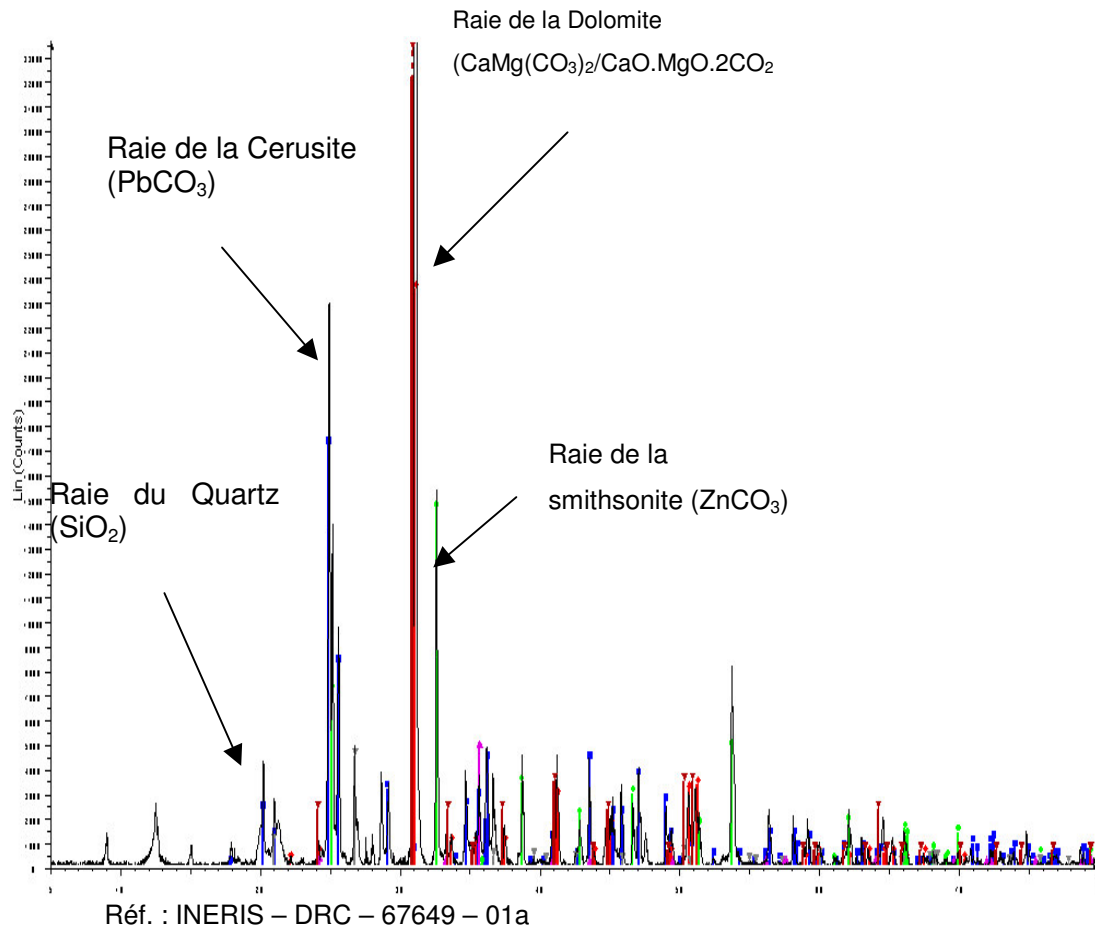
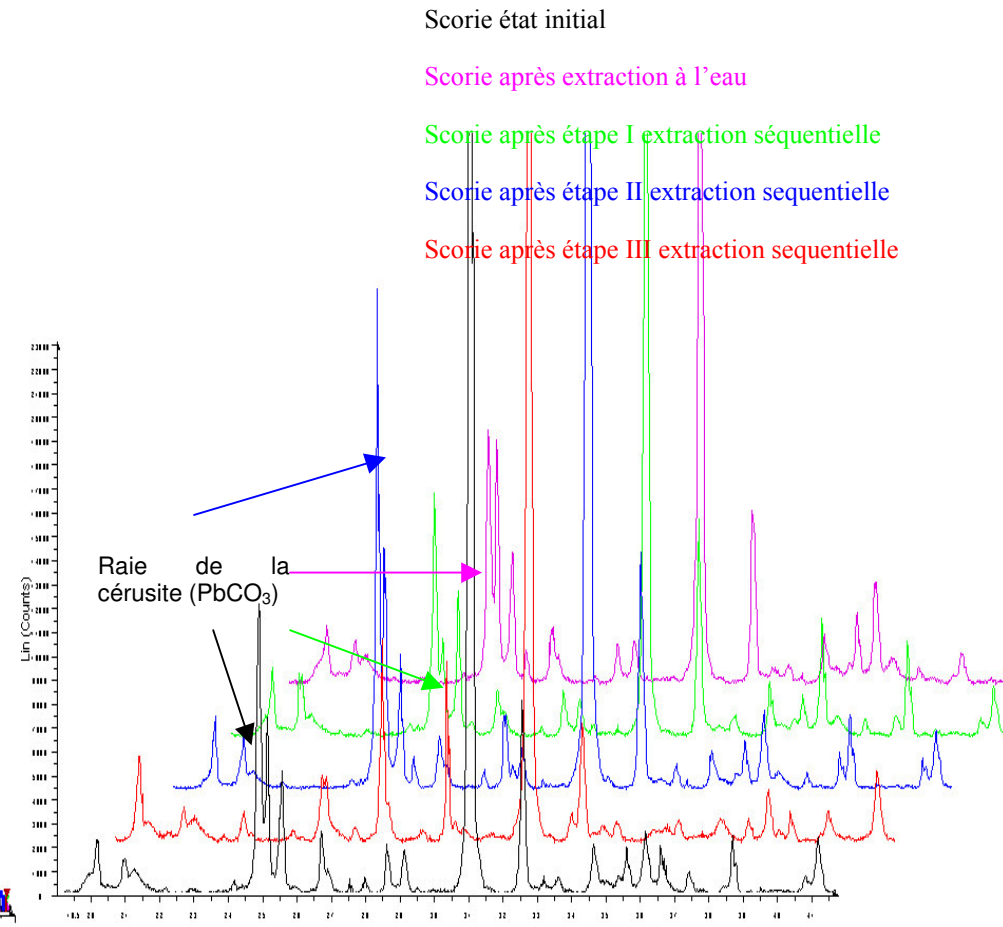


Figure 6 : Diffractogramme des scories à l'état initial et après extractions séquentielles



Occurrence en %	C	O	Mg	Al	Si	S	K	Ca	Ba	Fe	Zn	Pb
Scories initiaux	100	100	100	100	100	81.3	100	96.9	71.9	100	100	97
Phase I	100	100	30	100	100	30	15	15	30	85	100	85
Phase II	100	100	100	100	100	50	62.5	12.5	25	100	100	75
Phase III	100	100	100	100	100	55	44	100	22	100	100	50
Phase Iva	100	100	100	100	100	75	100	100	0	100	100	44
Phase IVb	100	100	100	100	100	30	100	100	30	100	97	87
Phase IVc	100	100	100	100	100	43	100	86	43	100	97	87
Phase Va	100	100	84	100	100	84	100	33	84	100	33	0
Phase Vb	100	100	100	100	100	100	100	50	100	33	0	0

Tableau 8 : Occurrence des éléments en MEBE après les différentes phases de l'extraction séquentielle

5.3.2.2 MICROSCOPE ELECTRONIQUE À BALAYAGE ENVIRONNEMENTAL

Les scories ont été observées et analysées au microscope électronique à balayage couplé à la microanalyse X afin d'identifier les éléments chimiques présents et d'estimer semi-quantitativement leurs concentrations à l'état particulaire. L'annexe A représente l'image en électrons rétrodiffusés des scories à l'état initial. Les particules les plus « brillantes » représentent les éléments les plus « lourds » comme le plomb, le zinc. Pour cet échantillon, l'analyse a porté sur 32 particules. Le tableau 8 regroupe l'occurrence des éléments détectés dans les 32 particules. On remarque que le plomb et le zinc sont présents dans quasiment toutes des particules analysées, ces résultats sont cohérents au vu de la nature minière des scories.

La même méthodologie a été appliquée à chaque résidu de scories obtenus après les différentes phases d'extractions séquentielles. L'annexe B présente les photos réalisées en électrons rétrodiffusés. Pour chaque échantillon, 10 particules ont été analysées et le tableau 8 regroupe l'occurrence des éléments observés dans les 10 particules et ce pour chaque phase d'extraction. On observe une décroissance de la présence du plomb dans les particules entre les phases I à IVa., ces résultats sont en adéquation avec les résultats des extractions séquentielles. En ce qui concerne les phases IVb et IVc, on remarque une augmentation aberrante de la présence du plomb dans les particules analysées. A contrario, le plomb n'est logiquement pas détecté dans les deux dernières phases d'extractions.

De plus, l'examen des différents spectres EDX (Cf. annexe C) réalisés a permis de mettre en évidence de possibles associations entre les différents éléments chimiques détectés. Par exemple, on retrouve généralement le plomb en présence de carbone et d'oxygène dans les scories initiales et dans les scories après les premières phases d'extractions séquentielles (étape I et II), alors que dans les étapes suivantes, on le retrouve en présence de soufre, de fer, de zinc.

Ces différentes associations possibles laissent penser que le plomb présent dans les scories ne l'est pas uniquement sous la forme de carbonates.

5.3.2.3 SPECTROMÉTRIE IRTF

L'analyse des scories par spectrométrie IRTF a été utilisée pour compléter et confirmer les résultats obtenus par diffractométrie X relatifs à la présence de carbonates de plomb dans les scories ou dans les résidus d'extractions séquentielles ou dans les échantillons ayant subi les tests de mesure de la bioaccessibilité.

5.3.2.3.1 SUR LES SCORIES INITIALES

La présence de cérusite dans l'une des fractions est mise en évidence par la présence de deux bandes infra-rouges caractéristiques du minéral en phase pur à 839 cm^{-1} et 678 cm^{-1} (Figure 7), ce qui est le cas du spectre représentatif des scories avant toute étape d'extraction (Figure 8).

Pour ce qui est de la quantification de la teneur en cérusite dans la scorie, l'utilisation de courbes d'étalonnage (élaborées à partir de cérusite dans du KBr) a permis de montrer que la cérusite représente 30 à 40% du plomb présent dans les scories.

5.3.2.3.2 SUR LES RESIDUS DES TESTS DE MESURE DE BIOACCESSIBILITÉ

La réalisation de spectres en provenance d'échantillons ayant subi les tests de mesure de bioaccessibilité (IVG et RIVM) montre l'absence des bandes caractéristiques de la cérusite (Figure 9 et Figure 10).

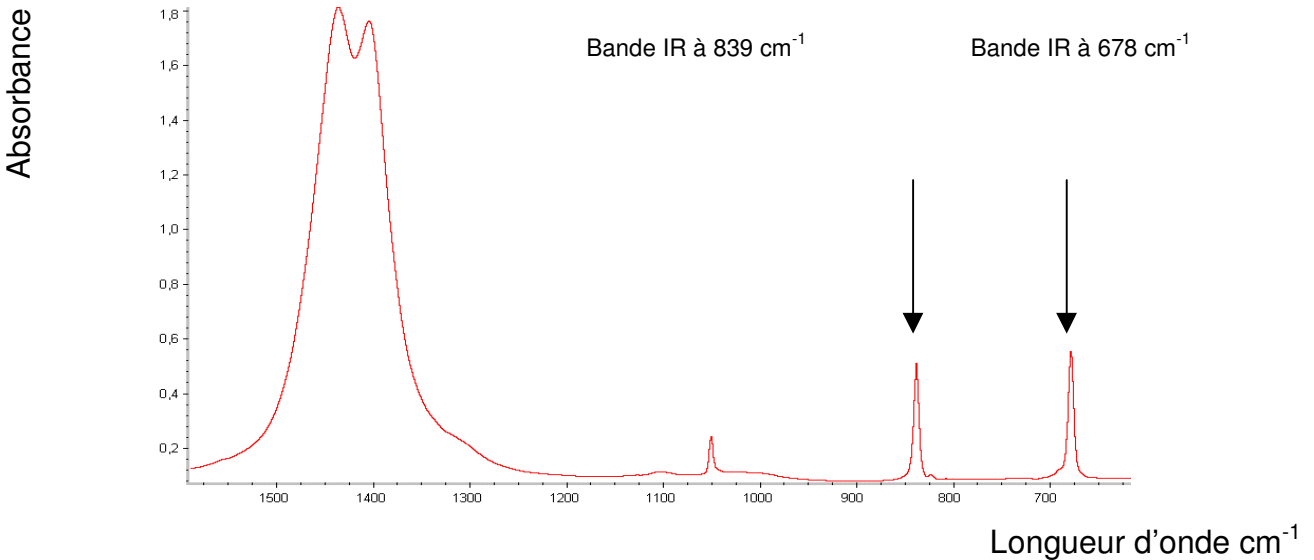


Figure 7 : Spectre infrarouge de la cérusite, phase pure

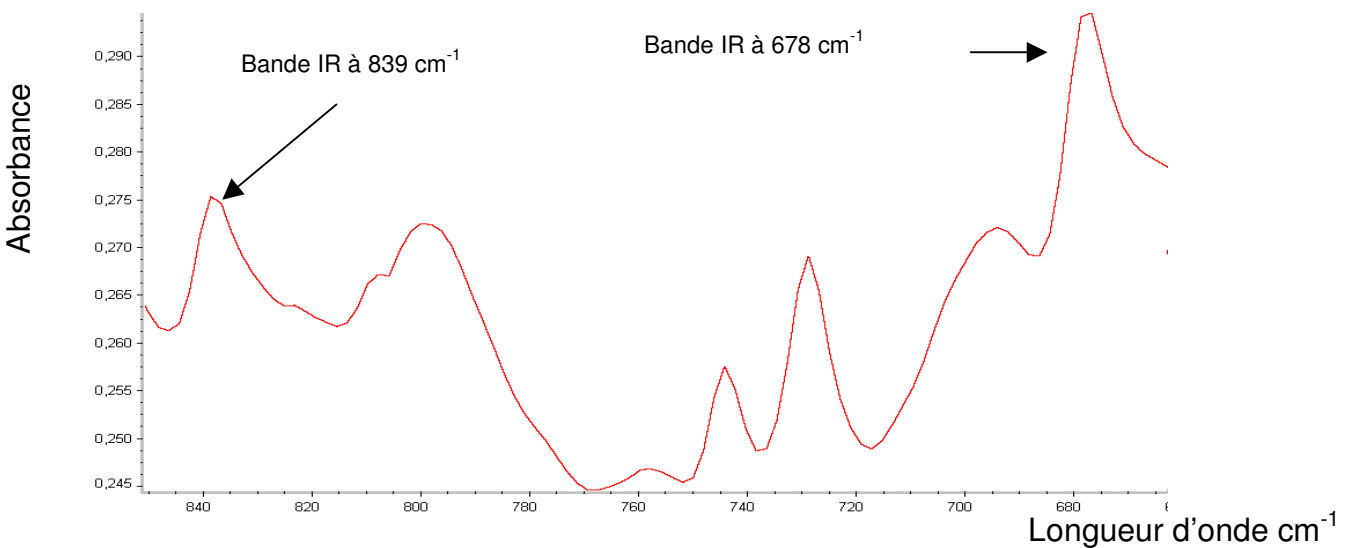


Figure 8 : Spectre infrarouge des scories avant toute extraction

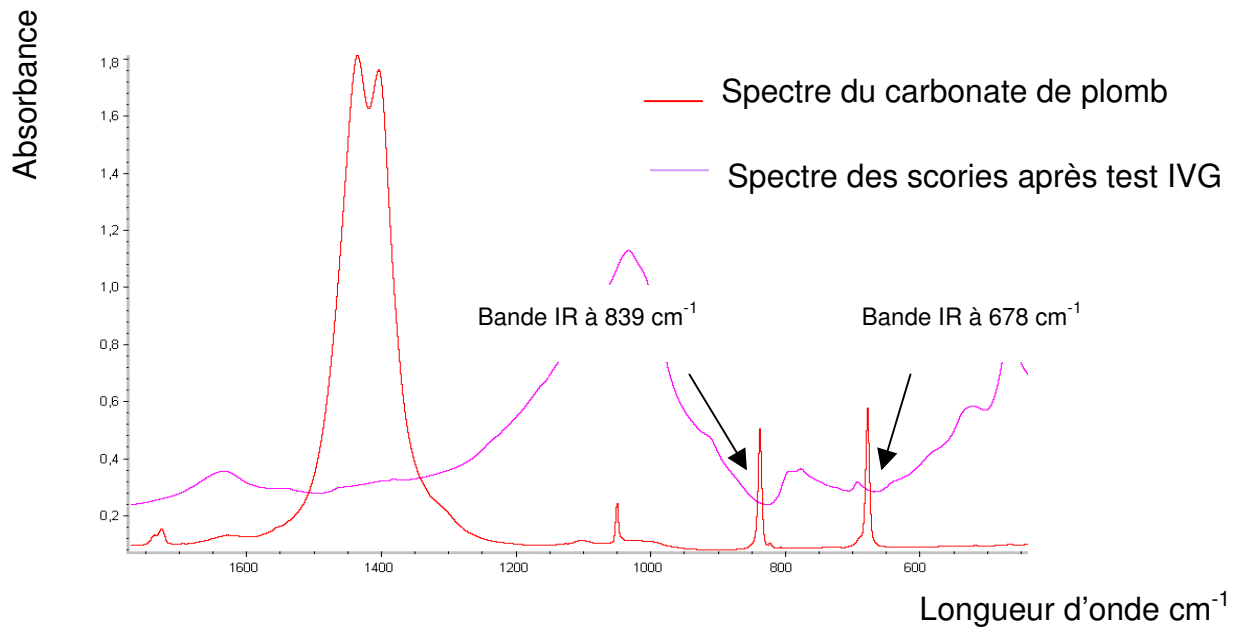


Figure 9 Spectre infrarouge de la cérusite (phase pure) et des scories après digestion par le test IVG

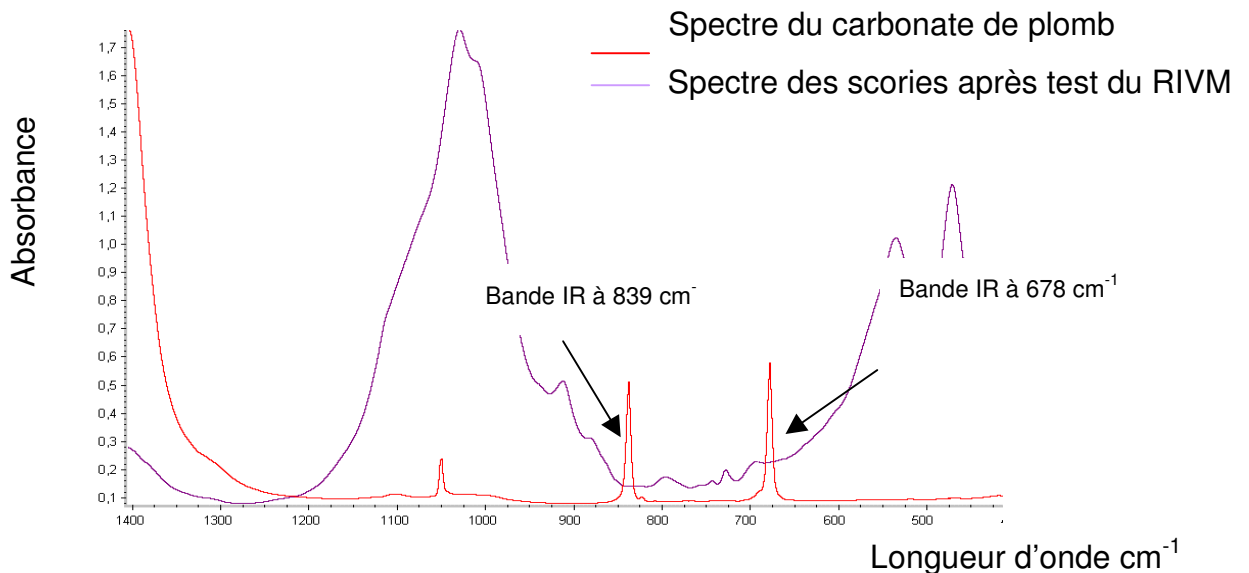


Figure 10 : Spectre infrarouge de la cérusite (phase pure) et des scories après digestion par le test RIVM

5.3.2.3.3 SUR LES RÉSIDUS DE L'EXTRACTION SÉQUENTIELLE

Les échantillons résiduels en provenance de chaque phase de l'extraction séquentielle ont également été analysés par spectrométrie IRTF afin d'évaluer l'impact des extractions sur la cérusite présente dans les scories.

La cérusite est toujours présente après les étapes I et II de l'extraction mais ses bandes caractéristiques n'apparaissent plus après la troisième étape (Figure 11, seules trois étapes sont identifiées sur la figure).

Ces résultats sont en concordance avec les analyses chimiques des différentes phases d'extractions séquentielles et les résultats obtenus par diffractométrie X qui montrent également la disparition de la cérusite au cours de la seconde phase de l'extraction séquentielle qui correspond à l'extraction des fractions associées aux carbonates.

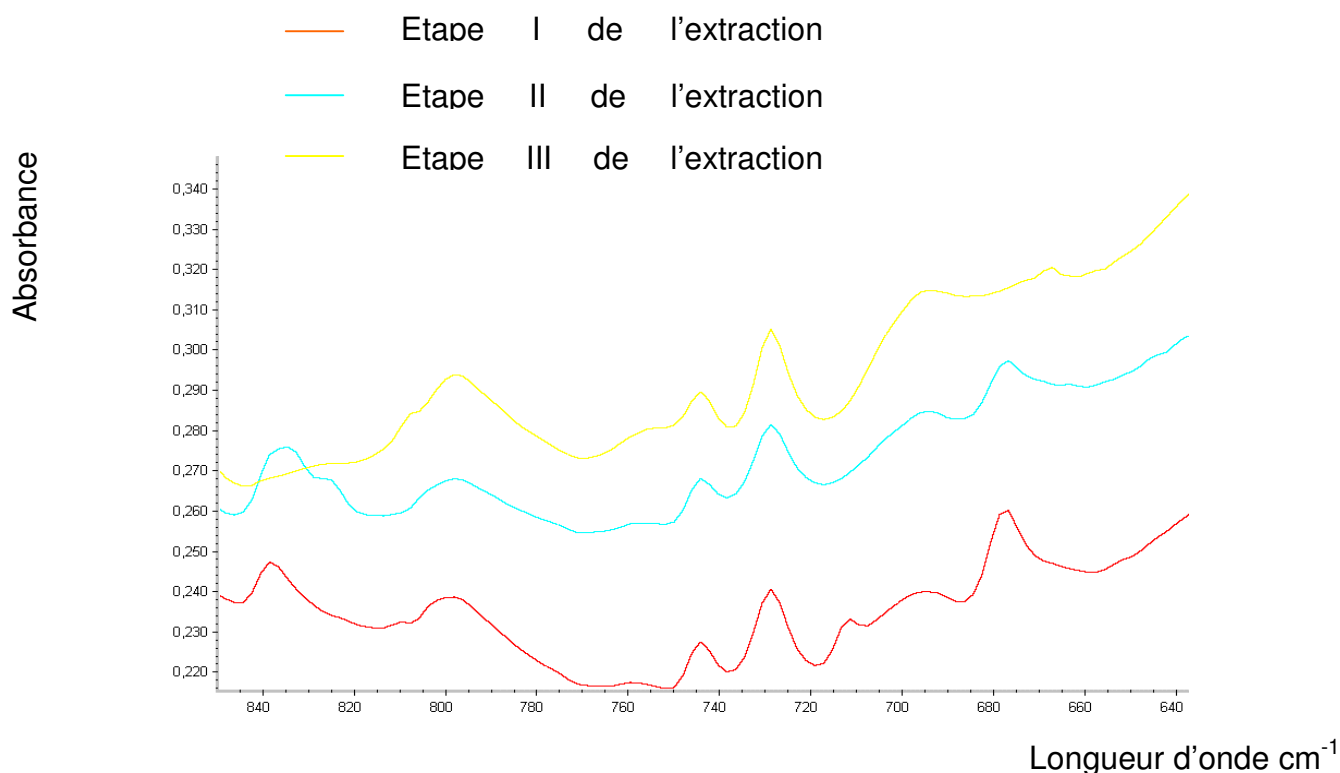


Figure 11 : Spectres infrarouges des résidus de scories après les trois premières phase de l'extraction séquentielle

6. DISCUSSION

6.1 BIOACCESSIBILITÉ DU PLOMB ENTRE DIFFERENTS ECHANTILLONS EN PROVENANCE D'UN MÊME SITE

L'étude a permis de montrer que la bioaccessibilité du plomb en provenance de quatre échantillons de sol en provenance d'un même site était différente en fonction de la nature des échantillons de sol ainsi que des teneurs en plomb caractéristiques de ces échantillons. Il se confirme donc que l'hypothèse fondamentale qui est considérée en évaluation du risque, pour la voie « ingestion de sol contaminée » (égalité de bioaccessibilité de l'élément considéré entre le sol

et le matériau ayant servi à l'élaboration de la VTR) est une hypothèse erronée qui conduit donc à un biais dans le calcul de risque.

Pour les deux tests mis en œuvre, la bioaccessibilité mesurée en phase gastrique est significativement supérieure à celle mesurée en phase intestinale. Ceci montre que la phase gastrique est une phase sensible qu'il convient de considérer au mieux dans la mesure de bioaccessibilité. Cette différence entre les deux phases peut notamment être expliquée par les conditions chimiques mis en jeu et notamment par un pH acide en phase gastrique qui entraîne une solubilisation des métaux.

Concernant les écarts de mesures observés entre les deux tests, certains paramètres expérimentaux peuvent expliquer les différences rencontrées. En particulier, le temps de résidence ou le type d'agitation utilisée peuvent influencer la mesure de bioaccessibilité. Pour le dernier paramètre, il est probable que l'extraction soit la plus efficace dans le cas du test RIVM puisque l'agitation rotative mise en œuvre dans ce cas permet d'augmenter les surfaces d'échange et favorise ainsi l'extraction.

Un point supplémentaire qui diffère dans les deux modèles de digestion choisis est la composition des diverses solutions digestives mises en œuvre dans les protocoles comme la teneur en bile ou la présence ou non de mucine. La bile est connue pour augmenter la capacité de solubilisation des composés faiblement solubles dans l'eau, complexer les métaux (De Zwart et al., 1999, Oomen et al., 2003) et créer un environnement apolaire favorable à l'extraction des contaminants hydrophobes (Holmann, 2002). Par conséquent, les sels de bile ont des propriétés surfactantes qui permettent d'augmenter l'extraction des éléments métalliques contenus dans les échantillons de sol (Oomen et al., 2003).

De façon pratique, l'évaluateur de risque doit avoir conscience que des tests différents donneront des mesures de bioaccessibilité différentes. Cependant la publication prochaine d'un protocole normalisé de mesure de bioaccessibilité devrait permettre à chaque évaluateur de travailler dans des conditions similaires.

6.2 LIEN ENTRE BIOACCESSIBILITÉ ET SPECIATION

La différence entre valeurs de bioaccessibilité obtenues pour les différents échantillons de sols mesurées dans le cadre de ce travail est probablement liée à la nature des liaisons entre les phases porteuses minérales et/ou organiques du sol et le plomb.

Le sol contient des constituants secondaires spécifiques très réactifs, tels que les argiles, l'humus et les gels ou oxydes et hydroxydes (Fe, Al, Mn), qui sont en général dotés de propriétés colloïdales (existence d'une grande surface spécifique assortie d'une charge) (Brunel, 2005). Ce sont ces éléments qui vont fixer les éléments métalliques d'une manière plus ou moins énergique et donc déterminer une grande partie de leur dynamique (Bataillard, 2002).

Les outils d'analyse employés ici ont permis d'appréhender de façon relativement exhaustive la spéciation du plomb dans l'échantillon de scories par le couplage extractions chimiques et spéciation physique. Les résultats de ces analyses ont notamment permis de montrer qu'une part importante du plomb (30% à 40%) présent dans les scories se trouvait associée aux carbonates. Les analyses physiques couplées aux tests de bioaccessibilité ont permis de montrer, en outre, que le plomb présent dans ce minéral était fortement bioaccessible.

Les tests de bioaccessibilité ont montré que la fraction de plomb extraite variait, selon les tests utilisés, entre 60% et 70% du plomb total. Au vu de ce résultat, il semblerait que la cérusite ne soit pas la seule forme de plomb bioaccessible dans les scories et que des formes présentes mais non formellement identifiées à ce stade soient également à considérer. Il pourrait s'agir de plomb associé aux sulfures (ex : PbS ou galène) ou à la fraction résiduelle de l'extraction séquentielle.

7. CONCLUSION

Les études menées ici avaient pour objectif de mettre en œuvre deux protocoles de mesure de la bioaccessibilité du plomb et de coupler cette mesure avec la spéciation de cet élément dans des sols en provenance d'un site minier.

Nos résultats ont montré que la totalité du plomb présent dans les différents échantillons de sols testés n'est pas bioaccessible et que les valeurs étaient fortement variables d'un échantillon à l'autre, quel que soit le test utilisé. Ceci confirme qu'une des hypothèses fondamentales sur lesquelles repose l'évaluation du risque pour la voie « ingestion de terre contaminée » est erronée.

Les outils de spéciation, couplés aux tests de bioaccessibilité, ont permis de montrer que le plomb associé aux carbonates (cérusite) est une phase hautement bioaccessible. Il est également probable que d'autres minéraux porteurs de plomb, non formellement identifiés à ce stade, soient également bioaccessibles.

Ainsi ce travail montre que la prise en compte de la bioaccessibilité dans les évaluations de risque permettrait de réaliser des évaluations plus pertinentes et ainsi de préconiser une gestion plus efficace des terres contaminées, auxquelles les cibles sont exposées du fait de l'ingestion de terre. Une des difficultés majeures est la sélection d'un protocole parmi l'ensemble des méthodes publiées à l'heure actuelle et relatives à la mesure de bioaccessibilité. Cette difficulté devrait prochainement être levée par la publication d'un protocole international normalisé.

La poursuite des recherches concernant la spéciation et la bioaccessibilité devrait permettre à l'avenir d'identifier les principales phases porteuses du plomb fortement accessibles. L'identification de ces phases au niveau d'un site, soit par l'analyse historique, soit par l'analyse minéralogique, permettrait d'avoir une première indication quant à la bioaccessibilité pour l'homme de l'élément considéré.

8. REFERENCES

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 (2) :149-164.

BATAILLARD, P. Evolution de la spéciation du plomb et du cadmium dans les sols. Thèse à l'école Nationale du Génie Rural, des Eaux et Forêts. (2002).

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 pages.

DAVIDS, A., RUBY, M.V., BLOOM, M., SCHOOF, R., FREEMAN, G. and BERGSTON, P.D. (1996). Mineralogic constraints on the bioavailability of arsenic in smelter-impacted soils. *Environmental Science & Technology*, 30, 392-399.

De ZWART, L.L., ROMPELBERG C.J.M., SIPS, A.J.A.M. et al. Anatomical and physiological differences between various species used in studies on the pharmacokinetics and toxicology of xenobiotics. A review of literature. RIVM report 623860010

FREEMAN, G.B., JOHNSON, J.D., KUTZ, P.J., PARHAM, F. and MATHEWS, H.B.; 1996. Comparative absorption of lead from contaminated soil and lead salts by weanling Fischer 344 rats. *Fundamental and Applied Toxicology*, 33, 109-119.

HOLMANN, H.Y.N., GOLDSTEIN, R.G., ASTON, D., YUN, M., KENGSOONTRA, J. (2002) Evaluation of gastrointestinal solubilization of petroleum hydrocarbon residues in soil using an in vitro physiologically based model. *Environmental Science and Technology*, 36, 1281-1286.

Norme ISO/DIS 17924-1 (2005) Soil quality assessment of human exposure from ingestion of soil and soil material. Part 1 : Guidance on the application and selection of physiologically based extraction methods for estimation of the human bioaccessibility/bioavailability of metals in soil.

KELLEY, M.E., BRAUNING, S.E., SCHOOF, R.A. et RUBY, M.V. (2002) Assessing oral bioavailability of metals in soil. Editor : Battelle Press, 124 pp.

OOMEN, A.G.; 2000. Determination of oral bioavailability of soil-borne contaminants. PhD, University of Utrecht.

OOMEN, A.G., HACK, A., MINEKUS, M., ZEIJDER E., CORNELIS, C., SCOETERS, G., VERSTRAETE, W., VAN DE WIELE, T., WRAGG, J., ROMPELBERG, C.J.M, SIPS, A., VAN WIJNEN, J.H. (2002). Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. *Environmental Sciences and 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. (2003) Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants.

PAUSTENBACH, D.J.; 2000. The practice of exposure assessment: A state-of-the-art review (Reprinted from *Principles and methods of toxicology*, 4th edition, 2001). *Journal of toxicology and environmental Health-Part-B-Critical Reviews*, 3, 179-291.

PIEJNENBURG, W.J.G.M., POSTHUMA, L., EISSACKERS, H.J.P., ALLEN, H.E. (1997) A conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes. *Ecotox. Environm. Safe.* 37, 163-172.

RENDELL et al., P.S., BATLEY, G.E. CAMERON, A.J. (1980) Adsorption as a control of metal concentration in sediment extracts? Environmental Science and Technology, 14, 314-318.

RODRIGUEZ, R.R. and BASTA, N.T.; (1999). An in vitro gastrointestinal method to estimate bioavailable arsenic in contaminated soils and solid media. Environment Science & Technology, 33, 642-649.

RUBY, M.V., DAVIS, A., SCHOOF, R., EBERLE, S. and SELLSTONE, C.M (1996). Estimation of lead and arsenic bioavailability using a physiologically based extraction test. Environmental Science & Technology, 30, 422-430.

SCHRODER, J.L., BASTA, N.J., 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, 512-521.

SIMONEAU C., GEISS, H., ROMECARI, A., ZOCCHI, P., HAMNAERT, P.(2001) Validation of methodologies for the release of di-isobutylphthalate (DINP) in saliva from toys. European Commission, DG joint research centre, Food Product Unit, Institute for Health and Consumer Protection, Ispra, Italie.

SIPS, A.J.A.M et EIJKEREN, J.C.H. (1996) Oral bioavailability of heavy metals and organic compound from soils : too complicated to absorb ? An inventorisation of factors affecting bioavailability of environmental contaminants from soil. RIVM report 711701002.

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.

SPOSITO, G. (1989). The chemistry of soils. Oxford University Press.

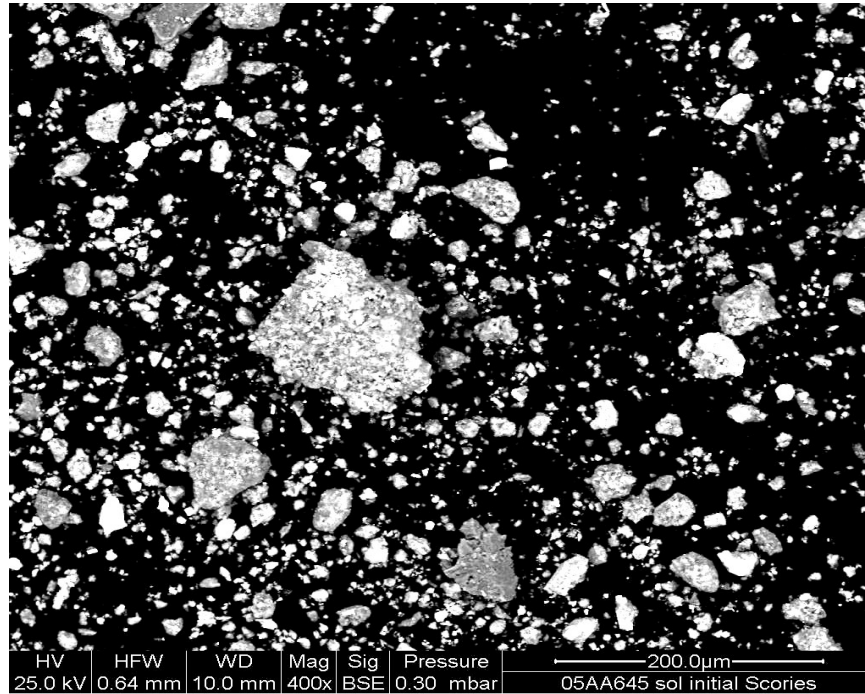
TESSIER, A., CAMPBELL, P.G.C. and BISSON, M.; 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. Analytical Chemistry, 51, 844-850.

LISTE DES ANNEXES

Repère	Désignation	Nombre de pages
A	Aspect des scories au MEBE (électrons rétrodiffusés)	1 A4
B	Aspect des scories au MEBE après les différentes phases de l'extraction séquentielle (électrons rétrodiffusés)	2 A4
C	Spectres EDX de particules de scories	1 A4

ANNEXE A

ASPECT DES SCORIES AU MEBE (ELECTRONS RETRODIFFUSÉS)



ANNEXE B : ASPECT DES SCORIES AU MEBE APRÈS LES DIFFÉRENTES PHASES DE L'EXTRACTION SÉQUENTIELLE (ÉLECTRONS RÉTRODIFFUSÉS)

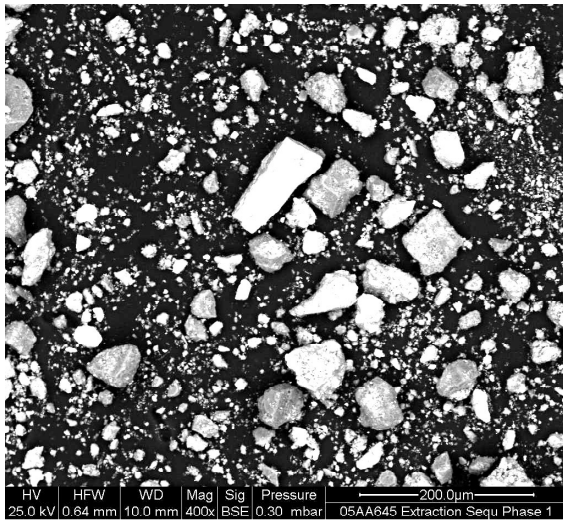


Figure 12 : Scorie après étape I de l'extraction séquentielle

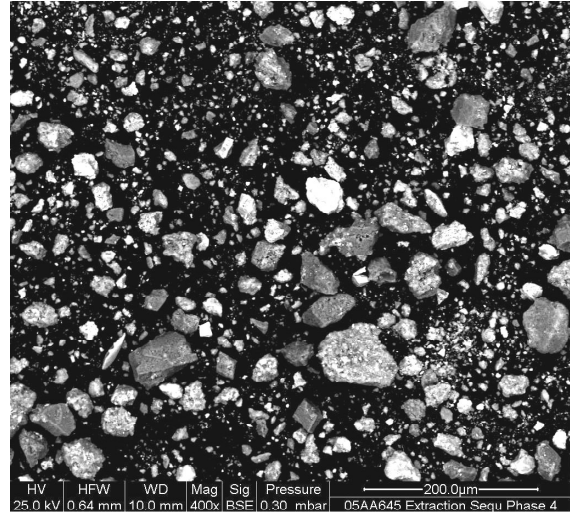


Figure 13 : Scorie après étape II de l'extraction séquentielle

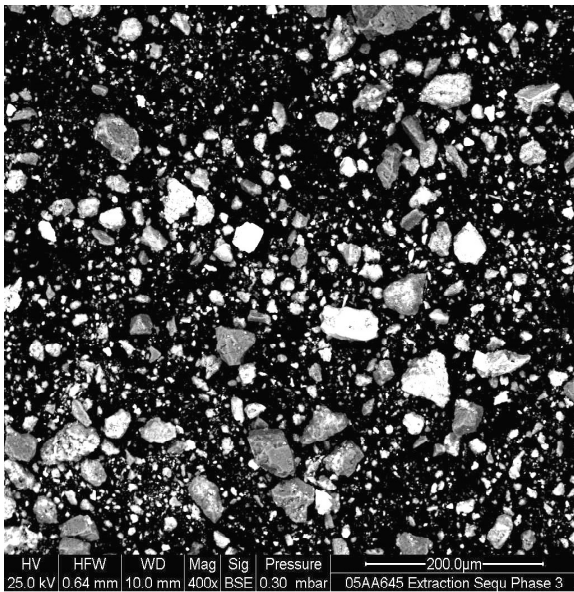


Figure 14 : Scorie après étape III de l'extraction séquentielle

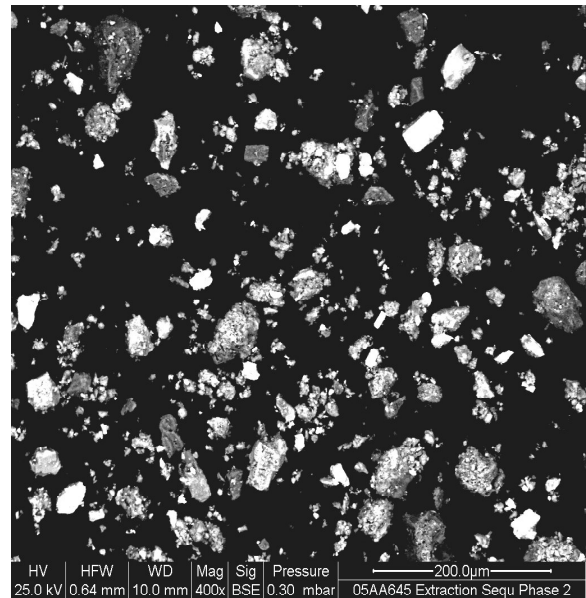


Figure 15 : Scorie après étape IVa de l'extraction séquentielle

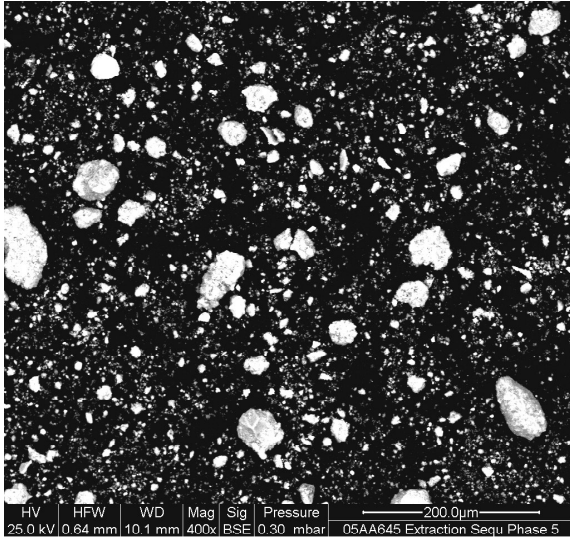


Figure 16 : Scorie après étape IVb de l'extraction séquentielle

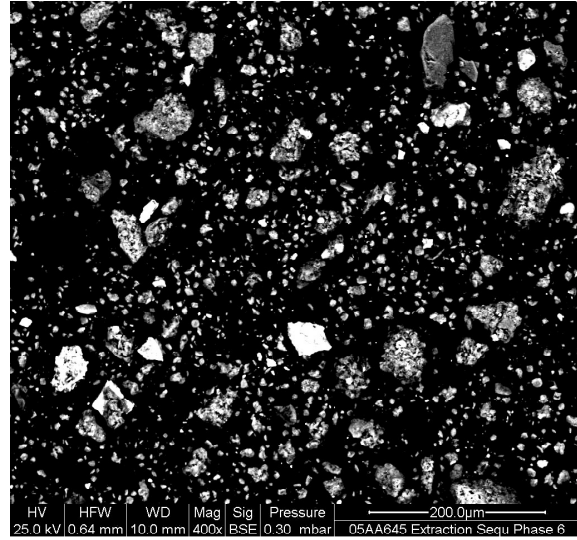


Figure 17 : Scorie après étape IVc de l'extraction séquentielle

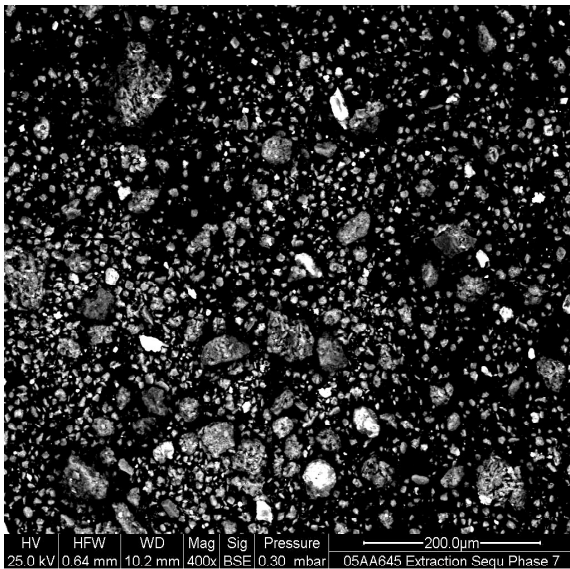


Figure 18 : Scorie après étape Va de l'extraction séquentielle

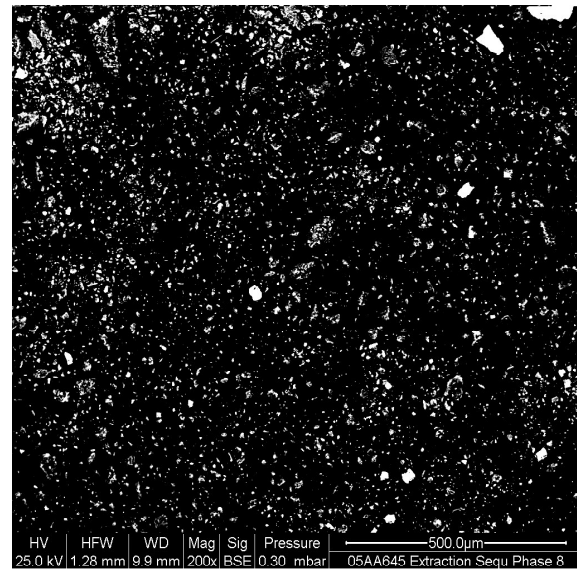


Figure 19 : Scorie après étape Vb de l'extraction séquentielle

ANNEXE C : SPECTRES EDX DE PARTICULES DE SCORIES

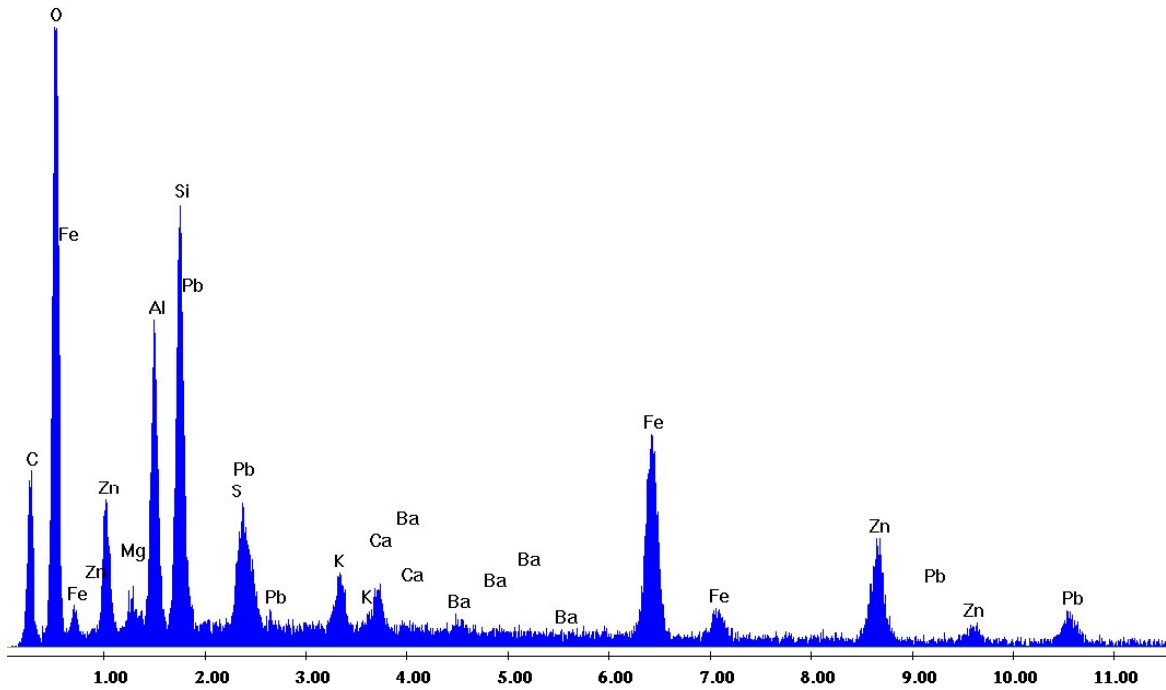


Figure 20 : Spectre d'une particule de scorie montrant les potentielles associations entre le plomb, l'oxygène, le zinc, le fer et le soufre

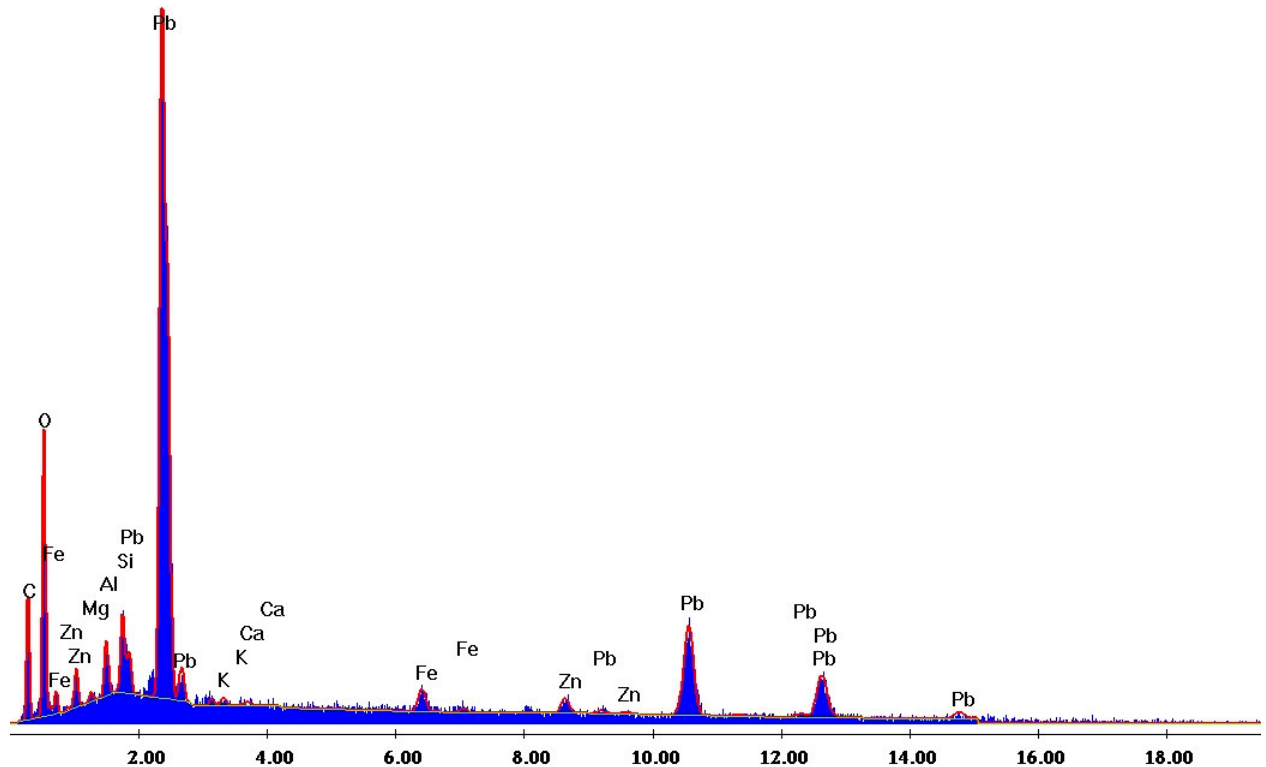


Figure 21 : Spectre d'une particule de scorie montrant les potentielles associations entre le plomb, le carbone et l'oxygène