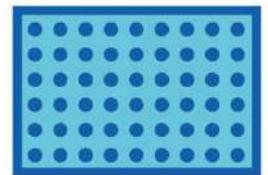
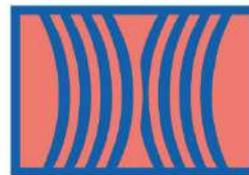


COMMUNICATIONS ORALES

5^e RENCONTRES NATIONALES

de la Recherche sur
les sites et sols pollués

04 et 05 février 2025 - Paris



Recueil des résumés

ATELIER 3C : Outils d'évaluation de
l'exposition et des impacts sur le
vivant

En partenariat avec :



Atelier 3C

Outils d'évaluation de l'exposition et des impacts sur le vivant

[Exposition et impacts vers le vivant]

Jardinage sur SSP : impacts sur la santé 3

▶ L'exemple du jardinage potager pour une approche systémique des impacts sur la santé

Prédiction de la biodisponibilité des PCB-NDL dans les sols 6

vers la validation d'un test *in vitro* de bioaccessibilité, étude du rTi-PBET

Bioaccessibilité des métaux/métalloïdes dans les sols 12

Un indicateur pertinent en santé-environnement

Better diagnose contamination in industrial territories: new approach using available fractions of potentially toxic elements 18

Étude de la phytodisponibilité, de la disponibilité environnementale et de la bioaccessibilité des éléments potentiellement toxiques sur le territoire minier et industriel de St-Etienne (Loire)

Analyse multi-échelle de l'impact du lithium sur les microorganismes 24

Jardinage sur SSP : impacts sur la santé

L'exemple du jardinage potager pour une approche systémique des impacts sur la santé

Eugénie ALBERT, Univ Rennes, EHESP, Inserm, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) - UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France, French Agency for ecological transition F-49004, Angers, France

Anne ROUE-LE GALL, Univ Rennes, EHESP, CNRS, ARENES-UMR 6051, 35000 Rennes, France
Philippe GLORENNEC Univ Rennes, EHESP, Inserm, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) - UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France

Résumé

Les méthodes de référence pour l'évaluation des effets des sites et sols pollués (SSP) sur la santé sont fondées sur le risque, particulièrement le risque chimique. Pourtant, une revue de littérature a permis de synthétiser les risques mais aussi les bénéfices sanitaires du jardinage potager. Une enquête dans les jardins collectifs rennais a complété cette revue des effets de l'ensemble des expositions liées au jardinage potager (exposome potager), notamment sur les aspects économiques. Ces résultats permettent de construire un modèle mixte (qualitatif et quantitatif) des effets du jardinage potager sur la santé ; ce modèle a été testé sur un cas fictif avec des pollutions et usages plausibles. Ce cas qui sera présenté lors des journées sites et sols pollués constitue une preuve de concept d'une évaluation intégrée des risques et bénéfices sanitaires du jardinage sur un sol pollué.

Introduction

L'outil principal pour la prise en compte des effets sur la santé des sites et sols pollués (SSP) est aujourd'hui l'évaluation des risques sanitaires (ERS). Découlant d'une logique historique de sécurité sanitaire (1), l'ERS se concentre sur les risques encourus, sans prendre en compte les éventuels bénéfices rendus par une activité ou leur perte éventuelle en cas d'interdiction de cet usage sur un SSP. Afin de mener des évaluations plus complètes et donc de soutenir des prises de décision intégrant la globalité des aspects sanitaires, nous avons élaboré un modèle conceptuel des liens entre jardinage et santé (cf. Figure 1) (2). Ainsi, selon une approche de santé environnementale, les bénéfices et risques inclus dans le modèle couvrent tous les déterminants de santé participant à l'exposome du jardinier.

L'objectif de ce travail est maintenant de tester ce modèle sur un cas vraisemblable de jardinage en contexte de contamination pour montrer la faisabilité (preuve de concept) de l'évaluation intégrée des impacts sur la santé du jardinage potager, applicable dans les contextes SSP.

Matériel et méthodes

Le modèle conceptuel sera testé pour plusieurs scénarios vraisemblables, à dire d'expert, de contaminations du sol en métaux lourds et HAP. Le modèle prend en compte les conditions de jardinage et mécanismes qui sous-tendent les impacts sur la santé : pour chacun des scénarios de contamination, nous testerons la modification des impacts sur la santé en fonction des caractéristiques socio-démographiques de la population et du contexte de jardinage (taille et type de jardin, motivations à jardiner,...). Une analyse de sensibilité sera conduite pour vérifier l'influence des différentes caractéristiques et des différents contextes. Les impacts pris en compte couvrant des données quantitatives et qualitatives, une approche mixte intégrant ces deux types de données sera employée.

Résultats et discussion

Les résultats attendus sont des profils semi-quantitatifs intégrés d'impacts sur la santé, selon les scénarios de contamination des sols, pour un contexte de jardinage donné. Ces résultats pourront ainsi enrichir le modèle proposé, discutés par rapport aux résultats d'une ERS seule et utilisés comme point de comparaison pour des modélisations sur d'autres sites.

Conclusions et perspectives

Ce travail permet de tester l'intérêt, la faisabilité et les limites d'une approche plus globale des effets sur la santé d'un usage sur un site pollué, en prenant l'exemple du jardinage potager. Les perspectives sont l'enrichissement du modèle au fur et à mesure que les connaissances sur les différents liens entre jardinage et santé s'étoffent, l'utilisation dans l'évaluation *a priori* de différents scénarios de décontamination et l'intégration des impacts sur l'environnement au même titre que les impacts sur la santé. Par ailleurs, cette démarche de modélisation pourrait être appliquée à d'autres usages présents sur SSP.

Références

1. Ministère de la Prévention. Ministère de la Santé et de la Prévention. 2023 [cité 24 nov 2023]. Sécurité sanitaire. Disponible sur: <https://sante.gouv.fr/prevention-en-sante/securite-sanitaire/>
2. Albert E, Roué-Le Gall A, Glorennec P. Leisure gardening and health: an overview of reviews in developed countries to inform integrated environmental health impact assessments. *Environmental Advances*. juill 2024;16:100538.
3. Briggs DJ. A framework for integrated environmental health impact assessment of systemic risks. *Environmental Health*. 27 nov 2008;7(1):61.

Remerciements

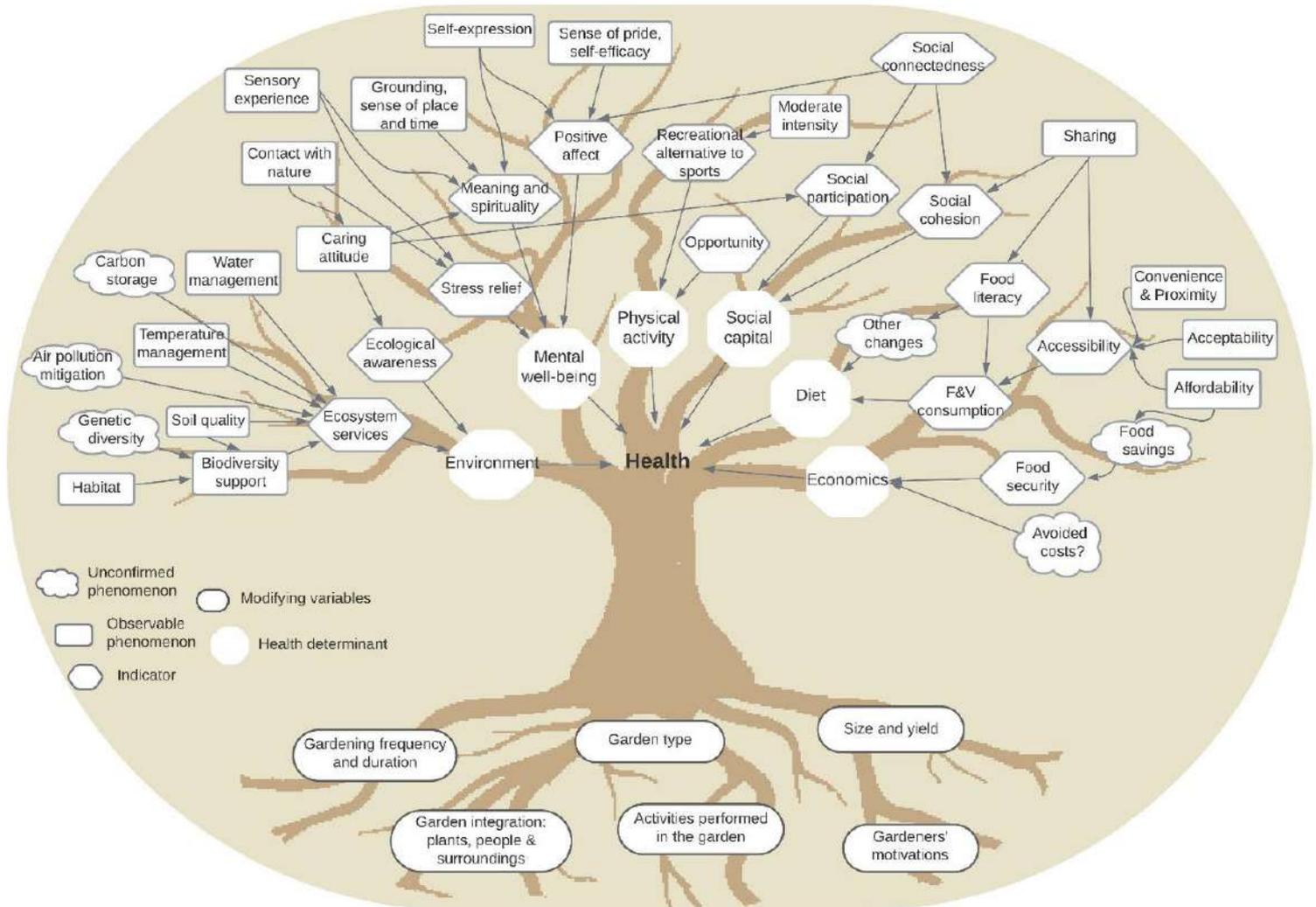
Pr Camille DUMAT, Pr Christophe SCHWARTZ, M. Franck MAROT.

Ville de Rennes, Association des jardins familiaux de la ville de Rennes.

Avec le soutien de l'Ademe et de la région Bretagne.

Titre en anglais : Gardening on contaminated land: towards an integrated, environmental health impact assessment

Figure 1: Schéma conceptuel des interconnexions entre effets du jardinage et impacts sur la santé via 6 déterminants de santé. D'après Albert et al. 2024. (2)



Prédiction de la biodisponibilité des PCB-NDL dans les sols :

Titre synthétique :

Prédiction *in vitro* de biodisponibilité des PCB-NDL dans les sols par le test rTi-PBET

vers la validation d'un test *in vitro* de bioaccessibilité, étude du rTi-PBET

Ronagul Turganova^{1,2}, Claire Soligot-Hognon¹, Paméla Hartmeyer¹, Stefan Jurjanz¹, Matthieu Delannoy¹

¹ Université de Lorraine, INRAE, Laboratoire Animal et Agroécosystèmes, Nancy F-54000, France

² Al-Farabi Kazakh National University, Faculty of Biology and Biotechnology, Almaty 050040, Kazakhstan

Résumé

L'évaluation de la biodisponibilité relative (RBA) des PCB est essentielle pour gérer les risques sanitaires et la contamination des sols. En particulier, la RBA permet d'affiner l'estimation de l'exposition humaine aux contaminants présents dans les sols pollués, ce qui est crucial pour une évaluation des risques sanitaires (ERS) précise. Toutefois aucun test n'est pour le moment validé pour prédire cette RBA, nécessitant des expérimentations animales coûteuse et posant des questions éthiques pour ces polluants, contrairement aux éléments potentiellement toxiques (ETP). Cette étude compare la RBA de quatre congénères NDL-PCB (101, 138, 153 et 180) en utilisant la méthode *in vitro* rTi-PBET et une réutilisation de données d'essais *in vivo* sur porcelets. Neuf échantillons de sol français et un échantillon de référence BCR481 ont été analysés. Les résultats montrent une similitude entre les mesures *in vivo* et *in vitro* pour les PCB 101, 138 et 153, sans différences significatives ($p > 0,2$). Cependant, pour le PCB 180, une différence significative ($p = 0,003$) indique que le test *in vitro* pourrait être moins précis. Ces premiers résultats sur un nombre limité d'échantillons suggèrent que la méthode rTi-PBET est fiable pour les PCB 101, 138 et 153, mais nécessite des améliorations pour le PCB 180. Les pistes d'amélioration de ces tests sont les modalités d'activation de la résine Tenax ainsi qu'une gamme plus large de sols, notamment en teneur en matière organique. En intégrant ces résultats, la méthode rTi-PBET peut améliorer la précision des ERS en tenant compte de la bioaccessibilité des contaminants, contribuant ainsi à une gestion plus efficace des sites et sols pollués.

Introduction

Les polychlorobiphényles (PCB) sont des polluants organiques persistants, interdits par la Convention de Stockholm en 2001 en raison de leur toxicité. Ils contaminent les sols et diverses matrices du fait de leur stabilité environnementale et leur hydrophobicité. La majorité des PCB dans les sols est bioaccumulée et persiste longtemps, posant des risques sanitaires majeurs, notamment par l'exposition alimentaire. Ces risques incluent des cancers et des effets sur les systèmes reproducteurs, immunitaire et endocrinien. Les enfants sont particulièrement vulnérables.

L'évaluation des risques sanitaires (ERS) pour l'ingestion de sols contaminés suppose souvent une biodisponibilité de 100 %, ce qui est irréaliste. Les méthodes *in vivo*, bien que contraignantes et soulevant des considérations éthiques majeures, sont utilisées pour évaluer la biodisponibilité relative (RBA). Les essais *in vitro*, comme le TI-PBET, offrent une alternative économique et contrôlée, simulant les conditions gastro-intestinales humaines. Ces essais ont montré des corrélations prometteuses avec les données *in vivo* pour certains contaminants organiques (Li et al., 2015). Toutefois une sous-estimation des niveaux de biodisponibilité est souvent notée, faisant que ces tests nécessitent toujours des ajustements et développements.

Ainsi, Afin d'améliorer la précision des ERS, il est essentiel de continuer le développement des outils et des méthodes pour mieux caractériser les expositions humaines, notamment en intégrant la notion de biodisponibilité par la bioaccessibilité orale. Si le test normé UBM (ISO, 2019) permet une estimation plus réaliste de l'exposition en ajustant la concentration totale de contaminants à la seule fraction biodisponible. Toutefois, ce test est actuellement limité à trois éléments métalliques (As, Cd et Pb) (Caboche, 2009) limitant son application aux seuls éléments traces métalliques.

Cette étude vise à évaluer la bioaccessibilité des PCB-NDL (101, 138, 153 et 180) dans des sols français en utilisant un test *in vitro* le rTI-PBET et à comparer ces résultats avec des données *in vivo* préalablement obtenus (Delannoy et al., 2015).

Matériel et Méthodes

Échantillonnage de sol et biodisponibilité relative

Les échantillons de sol de cinq zones historiquement contaminées en France (Saint-Cyprien, Korsec, Lyon, Ploufragan, Reverdy) ont été réalisés par le laboratoire L2A de 2012 à 2014. Ces sols contiennent des niveaux élevés de PCB en raison de fuites de transformateurs et de déchets industriels entre 1998 et 2008 (voir BASOL, MEDDE). Pour les détails sur l'échantillonnage et les méthodes et études de biodisponibilité relative, voir Delannoy et al., (2015).

Qualité des produits chimiques

Les PCB marqués au ^{13}C (Cambridge Isotope Laboratories, Inc) ont été utilisés pour la quantification analytique. Les solutions de stock standard ont été préparées dans du toluène (pureté 99%) avec des standards de calibration allant de 0 à 20 ng/mL. Les enzymes et les sels biliaires ont été achetés chez Sigma-Aldrich. Les solvants (acétone, toluène, hexane) de grade Pesticide résidue provenaient de Sigma-Aldrich. L'adsorbant poreux Tenax® a été activé avec de l'acétone et séché à 60°C avant utilisation. 500 mg de Tenax® ont été scellés dans des sachets de thé.

Qualité des blancs

Les blancs ont été préparés sans échantillons de sol, en ajoutant des étalons internes aux solutions digestives. Les niveaux de détection des congénères de PCB dans les échantillons blancs étaient inférieurs à 0,005 µg/g avec une récupération moyenne de 96%.

rTi- PBET

Le test de bioaccessibilité a été réalisé selon le protocole général de PBET de Ruby et al. (1996), avec une version mise à jour utilisant la résine Tenax® dite de Ti-PBET (Chen et al., 2020 ; Li et al., 2017). Les proportions présentes dans ces deux dernières publications ont été utilisées. Ce test simule les processus d'ingestion humaine en deux étapes : gastrique et intestinale. Une solution alimentaire a été préparée en ajustant le pH à 2,5 avec du HCl à 35 % en ajoutant divers composants d'une solution alimentaire (amidon de pomme de terre, tryptone, extrait de levure, caséine, etc.). La solution gastrique comprend du malate de sodium, du citrate trisodique, des acides acétique et lactique, et de la pepsine, avec un pH ajusté à 2,5. Les solutions ont été mélangées pendant 4 heures. Le sol avec les solutions digestives et gastriques a été agité pendant une heure à 37 °C et 180 tours par minute (phase gastrique, pH = 2,5). Le pH a ensuite été ajusté avec de la soude (NaOH, 2 mmol). La solution biliaire avec sels biliaires (0,07 mg) et pancréatine (0,02 mg), pH=7, a été ajoutée avant de passer à la phase intestinale. La Tenax® a ensuite été ajoutée dans la phase intestinale comme phase complexante, composée d'une résine polymère poreuse. Les vials ont ensuite été soumis à une agitation continue pendant 14 heures à 37 °C et 180 rpm. Le lendemain, la Tenax® a été lavée à l'eau ultrapure, séchée à 60 °C pendant plus de 2 heures, puis extraite trois fois avec de l'acétone par sonication pendant 20 minutes à 37 °C. Les surnageants ont été évaporés à 40 °C pendant 40 ± 5 minutes, condensés et dilués avec du toluène pour analyse en GC-MS/MS (Figure 1).

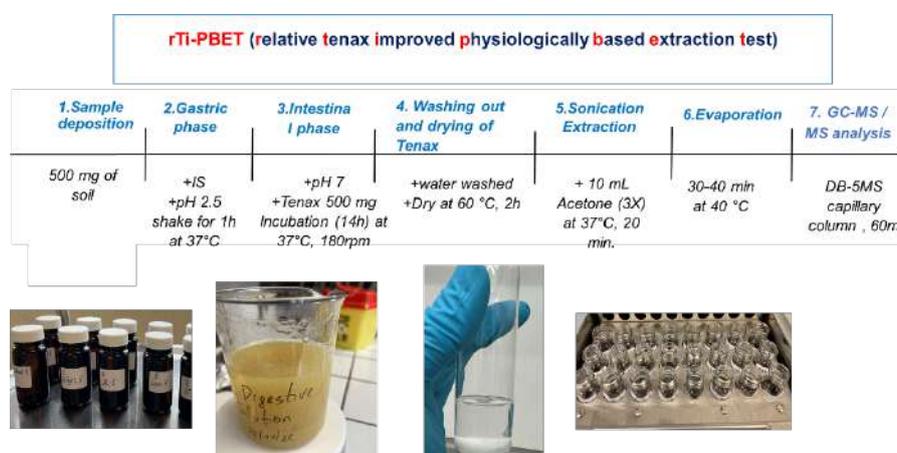


Figure 1 - Les étapes générales du test rTi-PBET

Analyse des PCB

Les congénères de PCB ont été analysés par GC-MS/MS avec une colonne capillaire DB-5MS de 60m. Le programme de température du four de la colonne allait de 110 à 300°C en 35 minutes. Les échantillons ont été injectés en splitless (1 µL). Quatre congénères de NDL-PCB et quatre standards internes (considérés comme 100% bioaccessibles et déposés dans la matrice alimentaire) ont été analysés dans 72 échantillons. Les congénères de PCB ont été identifiés en comparant leur temps de rétention à un mélange de standards de PCB en utilisant les ions fils et parents caractéristiques de fragments de ces molécules. Les fractions bioaccessibles relatives ont été calculés comme le ratio des congénères étudiés et les standards internes.

Résultats et discussion

Le test rTI-PBET, complété par l'ajout de Tenax, a été utilisé pour évaluer la fraction bioaccessible (BA%) de quatre congénères NDL-PCB dans 10 sols. Les résultats détaillés, incluant des intervalles de confiance (IC) à 95 %, sont présentés dans le tableau 1 pour l'ensemble des congénères NDL-PCB. La bioaccessibilité globale des NDL-PCB a dépassé 38 % pour tous les congénères, ce qui est en accord avec les valeurs de biodisponibilité relative (RBA) *in vivo* rapportées comme étant supérieures à 45 % (Delannoy et al., 2015). Cependant, la bioaccessibilité des congénères 101, 138, 153 et 180 varie de manière significative en fonction du type de sol.

Tableau 1 – Valeurs moyennes de la bioaccessibilité (en %) de quatre congénères de NDL-PCB extraits par rTI-PBET dans dix sols (n = 4). Les IC à 95 % ont été dérivés des données de bioaccessibilité.

Localisation des sols	Code	PCB 101	PCB 138	PCB 153	PCB 180
Saint Cyprien	A1	91% [78-104]	107% [86-128]	114% [109-118]	98% [90-105]
	A2	39% [35-43]	51% [44-57]	51% [43-60]	46% [39-52]
Korsec	B1	64% [58-70]	62% [53-71]	60% [51-69]	43% [35-51]
	B2	61% [57-64]	55% [52-58]	53% [49-58]	39% [36-42]
	B3	95% [79-111]	105% [83-128]	110% [87-133]	59% [47-72]
Ploufragan	D	66% [45-87]	57% [26-88]	58% [30-86]	38% [20-56]
Lyon	C	77% [55-99]	73% [50-96]	71% [52-91]	56% [38-75]
	E1	79% [74-85]	90% [86-95]	89% [88-91]	78% [71-85]
Reverdy	E2	92% [87-98]	82% [72-91]	82% [70-95]	68% [63-74]
BCR 481	R	82% [75-89]	75% [62-88]	71% [54-87]	48% [45-50]

Parmi les dix sols étudiés, une bioaccessibilité élevée (>70 %) pour les congénères 101, 138 et 153 a été observée dans six sites : A1, B3, C, E1, E2 et R. Des niveaux de bioaccessibilité modérés (50 % à 60 %) ont été observés dans les sites B1, B2 et D. En revanche, la bioaccessibilité du congoloméat PCB 180 était comparativement plus faible dans les sites A2, B1, B2, D et R, avec des valeurs comprises entre 38 % et 48 %. À l'inverse, les sols B3, C, E1 et E2 ont présenté une bioaccessibilité modérée pour le PCB 180, allant de 50 % à 80 %. Dans les sols ayant une faible bioaccessibilité pour l'ensemble des congénères, le sol A2 (Saint Cyprien) a affiché les valeurs les plus faibles, comprises entre 39 % et 50 %. Les congénères PCB 101 et PCB 180 ont montré une bioaccessibilité particulièrement faible par rapport aux PCB 138 et 153 dans ce sol. En revanche, le sol A1, également de Saint Cyprien, a montré une bioaccessibilité élevée (>91 %) pour tous les congénères, y compris le PCB 180, avec le PCB 153 présentant la bioaccessibilité la plus élevée à 114 %. Ces variations de bioaccessibilité peuvent être attribuées aux niveaux de chloration des PCB et à la teneur en matière organique (MO) des sols. Les congénères moins chlorés, tels que le PCB 101, ont montré une bioaccessibilité significativement plus élevée par rapport aux congénères plus chlorés et lipophiles, tels que le PCB 180. Ces résultats sont cohérents avec les études antérieures sur l'influence de la chloration sur la bioaccumulation et la bioaccessibilité (Oliver & Niimi, 1988 ; Delannoy et al., 2015 ; Lambiase et al., 2022).

Concernant le PCB 101, une bioaccessibilité élevée a également été observée dans les sols C, R, E1, B3 et E2 (70 % à 92 %). Des niveaux de bioaccessibilité modérés (environ 60 %) ont été observés dans les sols B1, B2 et D, tandis que le sol A2 a enregistré la bioaccessibilité la plus faible à 39 %. La fiabilité des mesures de bioaccessibilité *in vitro* obtenues avec le test rTI-PBET a été évaluée à l'aide d'un test t apparié, comparant les résultats *in vitro* aux valeurs de RBA *in vivo*. La Figure 2 illustre cette comparaison pour le PCB 101, en utilisant des intervalles de confiance (IC) à 95 % pour chaque approche.

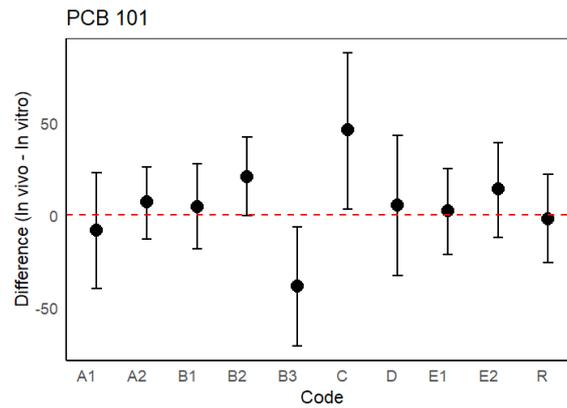


Figure 2 - Différence entre les données *in vivo* et *in vitro* (rTIPBET) par emplacement du sol.

Chaque point sur le graphique représente la différence moyenne entre les mesures *in vivo* et *in vitro*, avec des barres d'erreur indiquant les intervalles de confiance à 95 %. L'axe des abscisses représente les lieux d'échantillonnage, tandis que l'axe des ordonnées exprime les différences en pourcentage entre les ensembles de données. Une ligne rouge en pointillés à $y = 0$ indique l'absence de différence, impliquant un accord complet entre les deux méthodes. Le graphique met en évidence une incertitude considérable, notamment pour le sol de Lyon (codé C), où les mesures *in vivo* étaient significativement plus élevées que les résultats *in vitro*. Dans d'autres lieux, tels que A1, A2, B1, D, E1 et R, les différences étaient moins marquées, avec des intervalles de confiance qui se chevauchent.

La Figure 3 illustre également des comparaisons globales pour les quatre congénères, révélant aucune différence significative de RBA entre les méthodes *in vivo* et *in vitro* pour les PCB 101, 138 et 153, avec des valeurs de p de 0,4, 0,3 et 0,2 respectivement. Ces résultats suggèrent que les méthodes *in vitro* pourraient remplacer de manière fiable les mesures *in vivo* pour ces congénères. Cependant, pour le PCB 180, une différence significative de RBA entre les deux méthodes a été observée ($p = 0,003$), soulignant les limites de l'approche *in vitro* pour prédire avec précision la RBA de ce congénère. Bien que l'analyse des PCB 101, 138 et 153 ait indiqué un accord général entre les données *in vitro* et *in vivo*, des ajustements méthodologiques restent nécessaires pour le PCB 180.

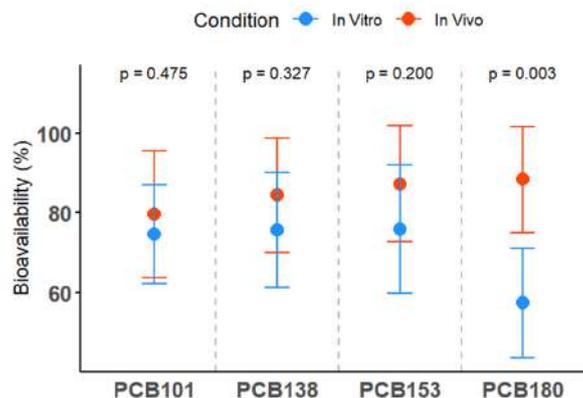


Figure 3 - Comparaison de la biodisponibilité relative *in vivo* et des données de bioaccessibilité *in vitro* dans les limites des valeurs p pour les congénères ND1-PCB (101, 138, 153 et 180). Pas de différence significative à $p > 0,05$ pour les PCB 101, 138 et 153. Différence significative pour le PCB 180 à $p < 0,05$.

Les caractéristiques des sols, en particulier la teneur et la structure de la matière organique, jouent un rôle déterminant dans la variabilité de la biodisponibilité des PCB. Les bioaccessibilités observées reflétaient étroitement les résultats de RBA *in vivo*, les sols contenant une MO moins fortement liée présentant des valeurs de RBA% plus élevées, comme l'illustre le sol A1. De plus, le rapport entre la

teneur en bile et en protéines influence de manière significative le transport des PCB hydrophobes. La bile facilite ce processus en formant des micelles, permettant le transport aqueux des PCB.

Pour améliorer l'exactitude des estimations de bioaccessibilité et les aligner davantage avec les données *in vivo*, des ajustements méthodologiques au test rTI-PBET sont essentiels. En outre, l'exploration de types de résines alternatives, telles que la résine XAD, pourrait améliorer le rapport coût-efficacité et soutenir le développement continu du test TI-PBET en tant qu'outil fiable pour l'évaluation de la bioaccessibilité.

Conclusion et perspectives

L'analyse suggère que la méthode rTI-PBET *in vitro* est comparable aux données *in vivo* pour mesurer la RBA de certains congénères PCB-NDL : PCB 101, 138 et 153. Cependant, une différence significative entre les deux méthodes pour le congénère PCB 180 indique que la méthodologie ne permet pas de prédire la RBA pour ce composé hautement lipophile. Ces résultats montrent qu'il est encore nécessaire d'améliorer le protocole de bioaccessibilité pour mieux refléter les conditions *in vitro*, tout en le testant sur une large gamme de sols afin de valider son efficacité par rapport aux valeurs de RBA *in vivo*. En ce sens, le projet BORG, en testant d'autres modalités d'évaluation de la bioaccessibilité, d'autres résines et complexants, permettra d'améliorer les essais en vue de leur prochaine intégration dans les Evaluations Quantitatives des Risques Sanitaires.

Références

- 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. Vandœuvre-lès-Nancy, INPL. <http://www.theses.fr/2009INPL049N>
- Delannoy, M., Fournier, A., Tankari Dan-Badjo, A., Schwarz, J., Lerch, S., Rychen, G., & Feidt, C. (2015). Impact of soil characteristics on relative bioavailability of NDL-PCBs in piglets. *Chemosphere*, 139, 393–401. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.098>
- ISO. (2019). NF ISO 17924—Qualité du sol—Évaluation de l'exposition humaine par ingestion de sol et de matériaux du sol—Mode opératoire pour l'estimation de la bioaccessibilité/biodisponibilité pour l'homme de métaux dans le sol (17924; Qualité Du Sol).
- Li, C., Cui, X. Y., Fan, Y. Y., Teng, Y., Nan, Z. R., & Ma, L. Q. (2015). Tenax as sorption sink for *in vitro* bioaccessibility measurement of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 196, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.09.016>

Remerciements

Les auteurs remercient l'ADEME et Franck Marot d'avoir apporté leur soutien au projet BORG. Les tests de disponibilité environnementale ont été réalisés sur la plateforme de Bio-disponibilité-Bio-activité (plateforme Bio-DA, Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France). L'analyse par GC-MS/MS a été réalisée sur la plateforme PASM (Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France).

Bioaccessibilité des métaux/métalloïdes dans les sols

Un indicateur pertinent en santé-environnement

Aurélie PELFRENE^{1*}, Madeleine BILLMANN¹, Ronagul TURGANOVA², Matthieu DELANNOY², Corinne HULOT³, Arnaud PAPIN³, Rabia BADREDDINE³, Marie GANTOIS⁴, Marie-Laure MOUCHARD⁴, Ronald CHARVET⁵, Stéphane FIEVET⁶, Benjamin Pauget⁷, Nicolas P.A. SABY⁸, Céline RATIE⁸, Claire FROGER⁸, Antonio BISPO⁸

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

²Université de Lorraine, INRAE, Laboratoire Animal et Agroécosystèmes (L2A), F-54000, Nancy, France

³Ineris, Parc Technologique Alata 60550 Verneuil-en-Halatte

⁴Ville de Paris, Direction des Espaces Verts et de l'Environnement, Service des Techniques du Végétal et de l'Agriculture, Division Expertises Sol et Végétal

⁵Ville de Paris, Direction de la Transition Écologique et du Climat, Pôle Qualité de l'Environnement, Département pollution des sols

⁶WESSLING France, 40 rue du Ruisseau, 38070 Saint-Quentin-Fallavier

⁷Tesora, 41 rue Périer, 92120 Montrouge

⁸INRAE, Info&Sols, F-45075 Orléans, France

Résumé

La bioaccessibilité orale simulant la digestion humaine est un outil de plus en plus utilisé et reconnu pour affiner l'exposition de l'Homme aux éléments métalliques en lien avec l'ingestion de particules de sol [1]. Le test *in vitro* normé UBM (ISO 17924:2019 [2]) est recommandé dans la méthodologie nationale de gestion des sites et sols pollués, actuellement validé *in vivo/in vitro* pour As, Cd et Pb. Pour As, la Haute Autorité de Santé (HAS ; [3]) recommande de dépister les populations dès lors que la concentration en As bioaccessible est supérieure à 25 mg/kg. Deux études illustrent la pertinence de la bioaccessibilité comme indicateur santé-environnement. La première visait à réaliser une étude statistique de la distribution en As bioaccessible à l'échelle nationale en considérant les sols du RMQS. Ainsi, sur les 353 échantillons considérés, à une exception près, les concentrations bioaccessibles sont inférieures à la valeur seuil de 25 mg/kg, avec une bioaccessibilité moyenne inférieure à 10 %. La seconde étude visait à élargir la portée du test UBM à d'autres éléments métalliques, notamment Cr et Ni. Leur bioaccessibilité montre des valeurs moyennes relativement faibles (< 10 % pour Cr et < 20 % pour Ni), indiquant qu'une part importante de la concentration totale de ces éléments est retenue dans le sol et peu disponible lors de la digestion. Ces résultats, très prometteurs, montrent l'intérêt de prendre en compte ce paramètre dans l'évaluation des risques sanitaires, mais sa validation est nécessaire au préalable par l'essai de biodisponibilité, réalisé sur un modèle porcelet.

Introduction

Dans le cadre de la gestion des sites et sols pollués, l'évaluation des risques sanitaires pour l'Homme, en lien avec l'ingestion de particules de sols contaminées, reste un domaine qui est soumis à de fortes incertitudes. Des divergences existent entre les outils prédictifs d'évaluation des expositions et les expositions réelles des populations. Pour mieux estimer les risques sanitaires et adapter les modes de gestions aux dangers que présentent les sites (multi)contaminés, il est nécessaire de développer des outils et des méthodes pour améliorer la caractérisation des expositions humaines. Il apparaît donc indispensable d'intégrer la notion de biodisponibilité (fraction de contaminant ayant passé les barrières biologiques) par un proxy en déterminant la bioaccessibilité orale (fraction libérée dans les sucs gastro-intestinaux humains et donc disponible pour l'absorption) [4]. Ce paramètre, estimé au moyen du test normé UBM (ISO 17924:2019 ; [2]) et appliqué en tant que facteur correctif de la concentration totale, permet une estimation plus réaliste de l'exposition dans les calculs de risques. Pour illustrer son utilisation, deux études sont présentées.

Plus spécifiquement sur l'arsenic, la HAS a publié en février 2020 une recommandation de bonne pratique à l'intention des professionnels de santé pour le dépistage, la prise en charge et le suivi des personnes potentiellement surexposées à l'arsenic inorganique du fait de leur lieu de résidence. Il s'agit dans ce document de s'intéresser plus spécifiquement à la concentration dans le sol de l'arsenic bioaccessible. Ainsi, lorsque la concentration d'As bioaccessible dans le sol est supérieure à 25 mg/kg, la HAS recommande de dépister les populations et plus spécifiquement de constituer une base de données rassemblant et conservant tous les résultats des évaluations biométriologiques de l'exposition. A ce jour, une évaluation statistique de la distribution spatiale des teneurs en arsenic total des horizons de surface des sols en France, basées sur les mesures des sites RMQS (Réseau de Mesures de la Qualité des Sols), est disponible. L'objectif de la première étude était de réaliser une étude statistique de la distribution des valeurs en As bioaccessible, notamment sur les zones présentant les plus fortes concentrations.

En dépit de nombreux travaux entrepris en France et des recommandations dans la méthodologie nationale de gestion des sites et sols pollués, la bioaccessibilité orale rencontre encore certaines difficultés opérationnelles et des limitations d'utilisation par les différents acteurs, notamment du fait que le test n'est validé *in vivo/in vitro* que pour trois éléments métalliques (As, Cd et Pb). L'objectif de cette seconde étude était d'étendre l'utilisation de la bioaccessibilité à d'autres éléments métalliques, et notamment le chrome et le nickel. Pour y répondre, des expérimentations *in vitro* et *in vivo* (sur le modèle porcelet) ont été mises en place sur des sols présentant une variabilité en termes de degrés de contamination, paramètres physico-chimiques, et contextes (industriel, minier, urbain...) en vue d'évaluer la bioaccessibilité et la biodisponibilité du Cr et Ni.

Matériel et méthodes

Etude sur l'arsenic :

Il s'agissait de disposer d'une collection d'échantillons de sols issus du RMQS et associés à une concentration en arsenic total supérieure à 25 mg/kg. Au total, 353 échantillons de sols (soit environ 15 % du territoire) ont été identifiés comme répondant à ce critère. Ainsi, la gamme de concentrations en As total couverte par ces échantillons est comprise entre 25 et 412 mg/kg. A ces échantillons est associée une base de données renseignant sur leurs paramètres physico-chimiques (i.e. teneurs en argile, limons et sables, CEC, bases échangeables, pH, teneurs en phosphore assimilable, calcaires totaux,

carbone organique, azote total, matière organique et éléments majeurs) ainsi que leur degré de contamination en As.

Au regard du nombre conséquent d'échantillons, la mesure de la bioaccessibilité a été faite selon la démarche suivante : (1) le test simplifié à l'HCl (0,65 % v/v) a été utilisé sur l'ensemble de la population d'échantillons afin de prédire la bioaccessibilité dans les phases gastrique (G) et gastro-intestinale (GI) [5] ; (2) sur une sélection de 50 échantillons parmi les 353, les prédictions obtenues ont été validées au moyen du test UBM normé ISO 17924:2019 [2].

Des analyses statistiques descriptives ainsi qu'une modélisation spatiale ont été réalisées sur la distribution en As bioaccessible. Plus spécifiquement, la distribution spatiale de la teneur en As bioaccessible dans le sol est supposée déterminée par l'influence combinée de l'activité humaine, du climat, de la végétation, du relief et du matériau parental. Dans le cadre de la cartographie à base de modélisation statistique, les propriétés du sol sont prédites spatialement en s'appuyant sur l'établissement d'un modèle statistique qui utilise un ensemble de covariables spatialement exhaustives (approche SCORPAN [6]).

Etude sur le chrome et le nickel :

Au total 41 échantillons de sols ont été collectés représentant 18 sites localisés en France métropolitaine, à la Réunion, en Nouvelle-Calédonie, en Belgique, en Ecosse, en Grèce et en Irlande du Nord. Les caractérisations sur ces sols ont porté sur : (i) la détermination des paramètres physico-chimiques (pH, CEC, teneurs en matière organique, en carbonates totaux, en oxydes de Fe, Al, Mn et en phosphore disponible) et des concentrations en Cr total, Cr (VI) et Ni total, (ii) l'identification des phases porteuses (e.g., carbonates, oxydes/oxyhydroxydes, matières organiques, sulfures), (iii) l'estimation de la bioaccessibilité orale au moyen du test *in vitro* UBM. A l'issue de l'acquisition de ces données, une sélection de 9 sols a été réalisée pour mener les expérimentations *in vivo*. Plus spécifiquement, les expérimentations *in vivo* ont été conduites en 2 temps : (1) évaluation de la relation dose-réponse en considérant 4 formes de références ; (2) réalisation des phases d'exposition des porcelets aux sols sélectionnés.

Résultats et discussion

Etude sur l'arsenic :

Les résultats sur la distribution statistique des concentrations totales en As et des concentrations extraites à l'HCl sont présentés dans la Figure 1. Les valeurs obtenues au moyen du test HCl ont ensuite été introduites dans les équations établies par Pelfrène et al. [5] en vue de prédire les concentrations bioaccessibles dans les phases G et GI classiquement évaluées au moyen du test UBM (Figure 1). Pour ces échantillons, les concentrations totales en As varient de 25 à 412 mg/kg, tandis que les concentrations extraites à l'HCl varient de 0,4 à 118 mg/kg. Après calcul, les concentrations bioaccessibles prédites varient de 0,7 à 76 mg/kg dans la phase G et de 0,7 à 61 mg/kg dans la phase GI. Exprimées par rapport aux concentrations totales, les pourcentages d'As bioaccessible prédits varient de 1,6 à 45 % dans la phase G (médiane à 7,1 %) et de 1,5 à 39 % dans la phase GI (médiane à 6,5 %). De plus, la comparaison des tests sur la sous-population de 50 échantillons met en évidence de très bonnes corrélations entre les valeurs prédites et mesurées et aucune différence significative n'est observée.

Ces résultats mettent en évidence l'intérêt de considérer la bioaccessibilité dans l'évaluation de l'exposition des populations. En effet, à une exception près, les concentrations bioaccessibles prédites

sont inférieures à la valeur seuil de 25 mg/kg. De plus, les pourcentages d'As bioaccessible sont relativement faibles (< 10 % en moyenne).

La majorité des sites sont au droit de zones agricoles, forestières et autres milieux naturels. Ce sont des milieux moins urbanisés avec des sources de pollutions pouvant se différencier des milieux urbains.

Un des objectifs de cette étude consistait à tester la possibilité de réaliser une cartographie des teneurs prédites bioaccessibles de l'arsenic par une analyse géostatistique. Il en ressort que la prédiction spatiale des teneurs moyennes en As bioaccessible dans la phase G (et globalement dans la phase GI également) ne présente pas de structure spatiale modélisable à l'échelle de notre étude. Les résultats de la validation du modèle géostatistique sont très faibles comme cela avait déjà montré pour d'autres contaminants [7].

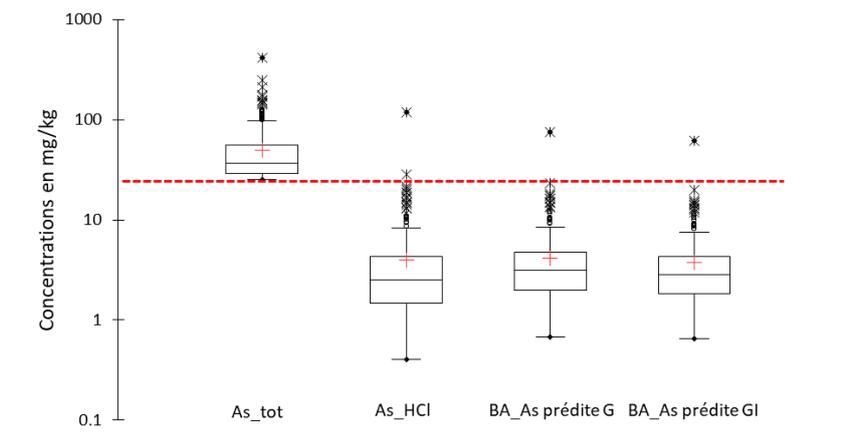


Figure 1. Distribution des concentrations en As (exprimées en mg/kg, n = 353). As_tot : concentrations totales ; As_HCl : concentrations extraites au moyen du test simplifié à l'HCl ; BA_As prédite G et BA_As prédite GI : concentrations bioaccessibles prédites dans les phases G (gastrique) et GI (gastro-intestinale) ; tracé rouge : valeur seuil à 25 mg/kg ; la croix rouge représente la moyenne calculée sur la sélection des sites RMQS.

Etude sur le chrome et le nickel :

Sur les 41 échantillons collectés, les résultats sur leur caractérisation physico-chimique ont permis d'en conserver 27 pour lesquels les concentrations totales en Cr et Ni étaient suffisantes et pertinentes au regard des teneurs rencontrées en gestion SSP et également en vue des essais *in vivo* et la phase de validation *in vitro/in vivo*. La distribution de ces concentrations ainsi que le pourcentage de Cr(VI) est présentée dans la Figure 2.

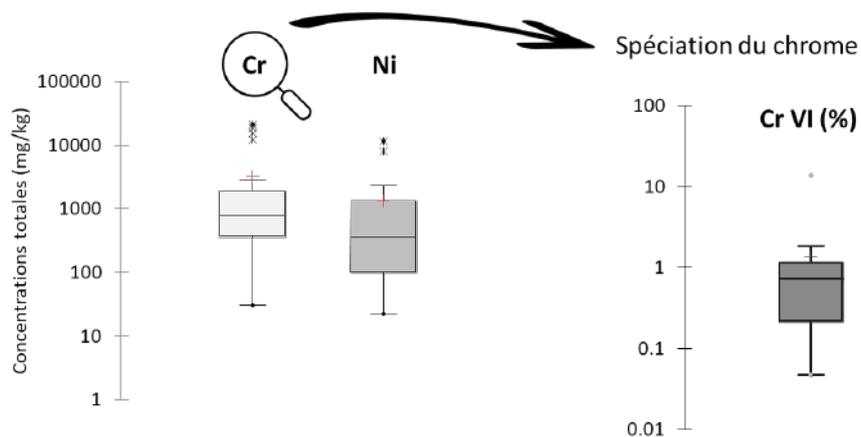


Figure 2. Distribution statistique des concentrations totales en Cr et Ni (en mg/kg ; n = 27) et distribution des pourcentages de Cr(VI) dans les échantillons.

La Figure 3 présente la distribution de la bioaccessibilité en Cr et en Ni dans les phases gastrique (G) et gastro-intestinale (GI) évaluée au moyen du test *in vitro* UBM.

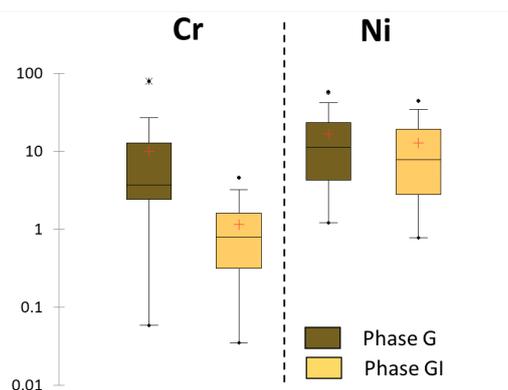


Figure 3. Distribution statistique de la bioaccessibilité orale de Cr et Ni (exprimée en % de la concentration totale; n = 27) dans les phases gastrique (G) et gastro-intestinale (GI).

Les valeurs de bioaccessibilité de Cr dans les phases G et GI vont respectivement de 0,06 à 80 % (10 % en moyenne et une valeur médiane de 4 %) et de 0,04 à 5 % (1 % en moyenne et une valeur médiane de 1 %). Pour Ni, la bioaccessibilité varie de 1,2 à 58 % (17 % en moyenne et une valeur médiane de 11 %) dans la phase G et de 0,8 à 45 % (13 % en moyenne et une valeur médiane de 8 %) dans la phase GI. D'une manière générale, la bioaccessibilité est légèrement plus élevée dans la phase gastrique, plus acide, que dans la phase gastro-intestinale où le pH est plus proche de la neutralité. Les gammes des bioaccessibilités du Cr et du Ni sont relativement faibles et peuvent dépendre également de l'origine des éléments (classiquement géogène < anthropique) [8].

Conclusions et perspectives

Concernant l'étude sur l'arsenic, les résultats obtenus montrent l'intérêt indéniable de prendre en compte sa bioaccessibilité pour mieux évaluer l'exposition des populations et *in fine* le risque. L'utilisation du test simplifié HCl en première approche fournit une très bonne prédiction de l'As bioaccessible, indiquant l'intérêt d'utiliser ce test en screening sur un jeu important d'échantillons. Ce test est par ailleurs en cours de normalisation à l'ISO (DIS 7303). La réalisation de l'analyse géostatistique n'a pas permis de proposer une cartographie des teneurs prédites bioaccessibles de l'arsenic. Cependant, l'analyse statistique basée sur le RMQS permet de caractériser de manière fine la distribution statistique de cet indicateur aux niveaux national et régional. Avec un seul site dépassant le seuil de 25 mg/kg, cette étude démontre qu'il existe une faible probabilité de dépasser la concentration d'As bioaccessible de 25 mg/kg.

Concernant l'étude sur le chrome et le nickel, en moyenne ces éléments présentent une faible bioaccessibilité, et ce, dans les deux phases, 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. Ces premiers résultats montrent l'intérêt de prendre en compte la bioaccessibilité du Cr et Ni au lieu des concentrations totales dans la gestion des sites et sols pollués qui pourrait être appliquée en tant que facteur correctif dans les évaluations de risques sanitaires. Ces résultats ont permis de sélectionner 9 échantillons parmi les 27 sols en vue de les exposer aux porcelets. Les résultats sur les expérimentations *in vivo* seront présentés en vue de comparer et déterminer le statut de validation du test UBM avec les données *in vivo* de biodisponibilité.

Références

- [1] Billmann M. et al. (2023). Science of The Total Environment, 896, 165263.
- [2] ISO 17924:2019, Soil quality — Assessment of human exposure from ingestion of soil and soil material — Procedure for the estimation of the human bioaccessibility/bioavailability of metals in soil.
- [3] Haute Autorité de Santé (HAS) (2020). Dépistage, prise en charge et suivi des personnes potentiellement surexposées à l'arsenic inorganique du fait de leur lieu de résidence – Méthode Recommandations pour la pratique clinique, 29 pp.
- [4] Paustenbach D.J. (2000). Toxicology and Environment Health, Part B 3, 179-291.
- [5] Pelfrène A. et al. (2020). Science of the Total Environment 727, 138553.
- [6] McBratney A.B. et al. (2003) On digital soil mapping. Geoderma 117, 3-52.
- [7] Villanneau E. et al. (2011). Science of the Total Environment 409, 3719-3731.
- [8] Billmann M. et al. (2024). Environmental Geochemistry and Health 46, 273.

Remerciements

Les auteurs remercient l'ADEME et tout particulièrement Franck Marot et Hélène Roussel pour leur soutien dans le cadre des projets BAsR et Bioac'ERS, ainsi que le GIS Sol pour l'accès aux échantillons du RMQS et les partenaires scientifiques en France et à l'étranger pour la fourniture d'échantillons de sols.

Better diagnose contamination in industrial territories: new approach using available fractions of potentially toxic elements

Étude de la phytodisponibilité, de la disponibilité environnementale et de la bioaccessibilité des éléments potentiellement toxiques sur le territoire minier et industriel de St-Etienne (Loire)

**Rachel Seillier^{1*}, Steve Peuble², Jérémie Riquier³, Olivier Faure⁴, Frédéric Paran⁵,
Baptiste Bouillot⁶**

¹ : Centre SPIN, Mines Saint-Etienne, SPIN, CNRS 5307 - Laboratoire Georges Friedel (LGF), F-42023, Saint-Etienne, France, rachel.seillier@emse.fr

² : Centre SPIN, Mines Saint-Etienne, SPIN, CNRS 5307 - LGF, CNRS 5600 - Environnement, Ville et Société (EVS), F-42023, Saint-Etienne, France, steve.peuble@emse.fr

³ : Université Jean Monnet, CNRS 5600 - EVS, F-42023, Saint-Etienne, France, jeremie.riquier@univ-st-etienne.fr

⁴ : Centre SPIN, Mines Saint-Etienne, SPIN, CNRS 5600 - EVS, F-42023, Saint-Etienne, France, ofaure@emse.fr

⁵ : Centre SPIN, Mines Saint-Etienne, SPIN, CNRS 5600 - EVS, F-42023, Saint-Etienne, France, frederic.paran@emse.fr

⁶ : Centre SPIN, Mines Saint-Etienne, SPIN, CNRS 5307 - LGF, F-42023, Saint-Etienne, France, Baptiste.bouillot@emse.fr

Résumé

La fraction totale des éléments potentiellement toxiques (EPT) présents dans les sols, actuellement considérée dans les diagnostics de contamination (identification du "danger" d'un site), ne permet pas d'anticiper leur voies de transferts ainsi que leur accumulation dans des organismes vivants. L'étude des fractions disponibles des EPT, étant réellement mobiles et potentiellement bioaccumulables, permet de mieux identifier les dangers des délaissés urbains, mais n'est pas couramment réalisée. La caractérisation de la disponibilité environnementale (fraction "facilement extractible"), ainsi que de la fraction phytodisponible (accumulée dans les feuilles de plantes) des EPT sur un site du territoire stéphanois, montrent de grandes variabilités avec la fraction totale. Pour faciliter l'étude, l'utilisation d'un indice dérivé d'indices existant, l'excès de danger (ED), est appliquée au site. Le caractère innovant de cet indice, agrégeant l'ensemble des éléments d'intérêts, est son application aux fractions disponibles, permettant la caractérisation du transfert des EPT vers les organismes vivants. Ces résultats permettent d'identifier plus précisément les dangers associés aux métaux/métalloïdes présent dans les délaissés urbains en s'appuyant sur l'étude des fractions disponibles du sol et des plantes.

Introduction

En France, la réhabilitation des délaissés urbains et des friches industrielles, est un enjeu majeur de l'objectif du "zéro artificialisation net"¹. Cet objectif vise à préserver les espaces naturels par le réemploi de terres déjà impactées par l'activité humaine. Les territoires marqués d'un lourd passé industriel, tels celui de Saint-Etienne, sont souvent fortement contaminés, notamment par des Eléments Potentiellement Toxiques (EPT ; e.g. As, Cd, Co, Cr, Cu, Mo, Ni, Pb, Ti, Zn), qui peuvent être transférés vers les écosystèmes et constituer ainsi un risque pour des cibles vivantes (populations humaines ou espèces animales et végétales) (Pucheux, Manier, et Faure 2021). La capacité de transfert des EPT, dont dépend le risque d'exposition d'une population à des contaminants toxiques, est contrôlée par les conditions biogéochimiques du sol comme le pH (Scattolin et al. 2021), la teneur en matière organique ou le type de végétation (Ghosh et Singh 2005). Le danger lié à la fraction "transférable" des EPT est encore peu étudié lors de réalisation de diagnostic de pollution mais peut être caractérisé par l'étude des fractions biodisponibles du sol, telles que la disponibilité environnementale, la phytodisponibilité et la bioaccessibilité. La disponibilité environnementale permet de déterminer la solubilité d'un élément et donc son potentiel de transfert aqueux (Novozamsky, Lexmond, et Houba 1993). La phytodisponibilité, quant à elle, informe sur l'accumulation d'un élément dans les différents organes d'un végétal (Remon et al. 2013). La bioaccessibilité quantifie la fraction d'un EPT assimilée par l'organisme pendant la digestion, permettant ainsi de mieux quantifier l'exposition au danger, notamment pour les populations humaines (Cánovas et al. 2023).

De nombreux auteurs ont proposé l'utilisation d'indices de pollution pour faciliter la caractérisation de la contamination du sol, soit en considérant chaque EPT de manière individuelle, soit en agrégeant tous les EPT dans un seul indice complexe. Pour les indices individuels, l'indice de géo-accumulation (Müller 1969) et le facteur d'enrichissement (Sutherland 2000) sont les plus utilisés. Concernant les indices agrégés, "l'indice de sécurité de contamination" (Pejman et al. 2015) et le "risque écologique potentiel" (Håkanson 1980) sont considérés comme étant les plus pertinents, pour l'évaluation de l'accumulation et du risque écologique (Kowalska et al. 2018). La caractérisation du danger d'exposition aux EPT sur des friches industrielles contaminées par plusieurs EPT, pourrait être facilitée par l'utilisation d'indice agrégeant les teneurs des contaminants. Dans cette étude, une nouvelle approche d'évaluation a été utilisée, reposant sur l'utilisation de l'indice d'excès de danger (ED), dérivé des indices précédents. La particularité de l'approche est d'étendre le calcul de cet indice aux fractions biodisponibles, plus représentatives du danger réel, alors que la majorité des indices sont utilisés uniquement sur les teneurs totales. Deux approches complémentaires ont été suivies pour développer cet indice et en tester l'applicabilité : i/ l'étude des teneurs totales et de la disponibilité environnementale des EPT pour des sites témoins, supposés représentatifs du fond local ambiant et ii/ l'étude des teneurs totales et biodisponibles (disponibilité environnementale, biodisponibilité et bioaccessibilité) sur des friches contaminées du territoire stéphanois (Loire).

¹ Code de l'urbanisme, Article L101-2 – Légifrance

Matériels et méthodes

Campagne de terrain

Deux échelles de travail différentes ont été considérées : celle de l'ensemble du bassin minier et industriel stéphanois (superficie totale de 1 584 km²) se concentrant sur les parcs (péri-)urbains et les sédiments de cours d'eaux, et celle de deux friches industrielles (friches "CHARVIN" et "AKERS"), d'une surface de 8 275 m² et 73 500 m² respectivement. Cette double stratégie a deux objectifs : (i) définir le fond ambiant (par l'analyse de 42 parcs (péri-)urbains et 33 sédiments de cours d'eau) et (ii) mieux quantifier les transferts des EPT sur sites contaminés (par l'analyse de 90 échantillons de plantes et 80 échantillons de sol, par friche).

Les friches étudiées ont été choisies en raison de leur différences en termes de localisation et d'activité industrielle passée. Le site "CHARVIN" a hébergé pendant près de 90 ans des manufactures de cycle et de pièces d'armement ; le site "AKERS" a été occupé pendant près de 180 ans par des activités essentiellement de fonderie et de métallurgie. Sur chacun des sites, des échantillons à la fois, de sol superficiel (0-15 cm) et de feuilles de plantes ont été collectés. Les prélèvements de sol ont été réalisés après identification des zones sans données ou à fortes anomalies d'après le diagnostic initial de contamination déjà réalisé par un cabinet d'étude sur ces friches. Le prélèvement des plantes a été réalisé selon un échantillonnage composite réunissant les feuilles de cinq espèces différentes pour chaque point de prélèvement ; cette stratégie a pour but de constituer un échantillon représentatif de la communauté végétale présente sur site (Pauget et al., 2015).

Analyse et traitement

Les échantillons de sols et sédiments ont été séchés à l'étuve à 60 °C pendant 24 à 72 h. Les sols ont été tamisés à < 2 mm et les sédiments à < 125 µm (correspondant à la granulométrie de la base de données SIGMINES²).

La fraction totale en EPT des sols et sédiments a été extraite par digestion à l'eau régale suivant la norme ISO 11466. La disponibilité environnementale des EPT a été évaluée après extraction dans une solution dans du chlorure de calcium (CaCl₂ : 0,01 M) selon le protocole de Houba et al. (2000). La fraction phytodisponible est obtenue après digestion d'échantillons composites de feuilles selon Pauget et al (2015).

Tous les échantillons, après extraction, sont stockés au réfrigérateur (4 °C) jusqu'à leur analyse, réalisés à l'aide d'un spectromètre de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS, Agilent 7 800).

Les données récoltées sont ensuite traitées par cartographie numérique sous ArcGIS Pro à l'aide de la méthode de la pondération par l'inverse de la distance. Pour faciliter la lecture des cartes, les données obtenues ont été comparées à la distribution de données témoins, représentatives de sites non contaminés. Pour les teneurs totales en EPT, les données de référence ont été extraites de la BDSolU (<https://www.bdsolu.fr/fr>) ; pour les teneurs extractibles au CaCl₂ et les teneurs phytodisponibles, les données témoins ont été extraites de la base de données du programme ADEME "Bioindicateurs" (<https://ecobiosoil.univ-rennes1.fr/ADEME-Bioindicateur/>). Quatre gammes de valeurs ont été définies à partir de la distribution de ces données de référence (Reimann, Filzmoser, et Garrett 2005) : les teneurs habituelles (valeurs inférieures à la vibrisse supérieure interne de la distribution témoin), les anomalies modérées (valeurs comprises entre la vibrisse supérieure interne et la vibrisse supérieure externe), les

² Données de l'inventaire géologique minier français réalisé par le BRGM (1975 – 1991). SIGMINES est une base de données nationale, regroupant les teneurs naturelles du fond géochimique ambiant sur les territoires cristallins, à partir de l'analyse de colluvions. RP-62960-FR

anomalies fortes (valeurs comprises entre la vibrisse supérieure externe et le maximum de la distribution témoin) et les anomalies extrêmes (valeurs supérieures au maximum de la distribution témoin). Pour chaque fraction étudiée (teneurs totales, disponibilité environnementale et phytodisponibilité) les données brutes de concentrations ont été converties en valeurs "d'excès de danger" (ED) tel que :

$$ED^i = \left(\frac{C_m^i}{C_{Ref}^i} \right) \times k^i$$

C_m : teneur mesurée, C_r : valeur de référence (fond géochimique), k_i : constante de toxicité de l'élément i (k_{As} : 10 ; k_{Cd} : 30 ; k_{Cr} : 2 ; k_{Cu} , k_{Ni} et k_{Pb} : 5 ; k_{Zn} : 1)

Finalement, pour chaque point d'échantillonnage, les excès de danger lié à chaque élément peuvent être additionnés pour construire un indice "d'excès de danger intégré" (EDI) tel que :

$$EDI = \sum_{i=1}^n ED_i$$

La cartographie des EDI permet d'obtenir une représentation synthétique du danger global lié aux EPT, pour chaque fraction considérée (teneurs totales, disponibilité environnementale et phytodisponibilité) sur les sites étudiés.

Résultats et discussion

La figure 1 présente les indices d'excès de danger intégré pour 7 EPT (As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb et Zn)", construit en considérant les teneurs totales du sol en EPT (Figure 1a), leur disponibilité environnementale (Figure 1b) et leur phytodisponibilité (Figure 1c) sur le site "Charvin. Les résultats obtenus montrent que les trois cartes ne sont pas superposables. De fait, lorsque l'on considère les teneurs totales en EPT (Fig. 1.a), le site étudié peut être considéré comme présentant un excès de danger modéré, par rapport aux sites témoins de la BDSolU ; on peut noter que cet excès de danger présente une distribution homogène sur l'ensemble du site. À l'inverse, lorsque l'on considère la disponibilité environnementale des EPT (Fig. 1b), les valeurs obtenues restent très majoritairement dans la gamme des valeurs habituelles, observables sur des sites non contaminés ; il n'y a donc manifestement pas, ou très peu, d'excès de danger lié à la fraction mobile des EPT. Enfin, lorsque l'on considère la phytodisponible (Fig. 1c), une carte plus nuancée est obtenue : en effet, la végétation d'une grande partie nord du site n'indique aucun excès de danger, par rapport à la végétation de sites témoins non contaminés, alors que la zone sud du site montre des anomalies modérées à fortes, indiquant un transfert anormalement élevé des éléments mesurés.

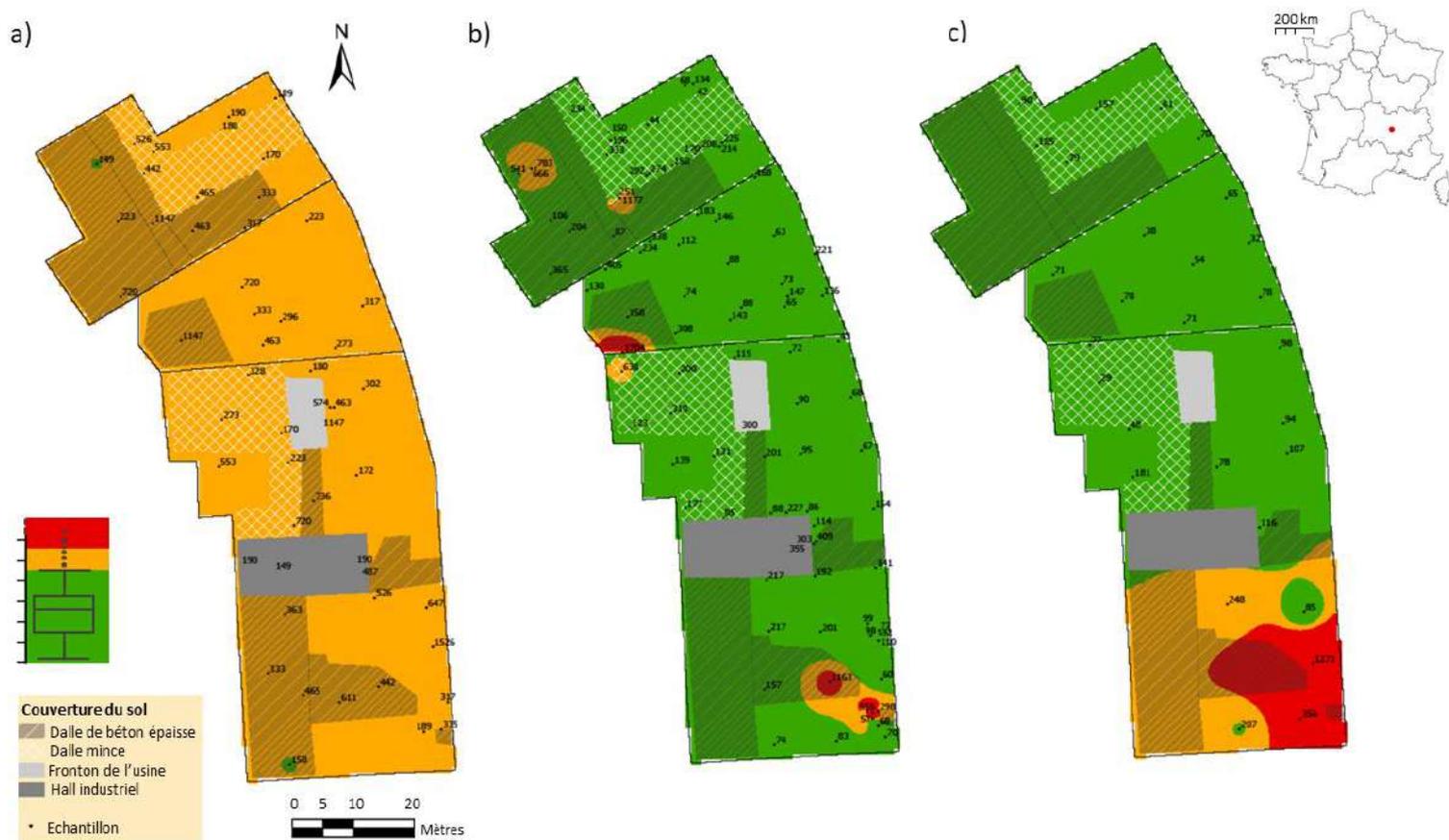


Figure 1 : Cartes d'interpolation de l'indice d'excès de danger (ED) des métaux/métalloïdes pour a) la teneur totale (mg/kg), b) la disponibilité environnementale ($\mu\text{g}/\text{kg}$) et c) la phytodisponibilité (mg/kg) sur une friche (CHARVIN) du territoire de Saint-Etienne, France. La méthode cartographique utilisée est la pondération par l'inverse de la distance. Le diagramme en boîte montre les limites de classe, FI étant la frontière interne et FE la frontière externe.

Conclusions et perspectives

Les premiers résultats présentés dans cette étude montrent que l'estimation du danger associé à un site contaminé n'est pas une tâche triviale. De fait, selon la fraction du sol où ce danger est évalué (teneur totale, disponibilité environnementale et phytodisponibilité), des résultats très différents peuvent être obtenus. Sur le site Charvin, retenu dans cette présentation, l'étude des seules teneurs totales en EPT ne permet pas d'anticiper leurs teneurs disponibles et/ou accumulables dans la végétation du site, et conduisent manifestement à une surestimation des risques. L'utilisation de trois indices de danger intégrés, permettant d'éclairer trois aspects du danger pourrait donc représenter un bon outils d'aide à la décision pour les gestionnaires de site. À ces trois aspects du danger, il pourrait être utile d'en ajouter un quatrième, celui de la bioaccessibilité orale, permettant de mieux évaluer les risques pour la santé humaine ; des analyses sont actuellement en cours pour compléter cet aspect.

Il faut finalement souligner que l'interprétation des résultats analytiques, reposant sur un référentiel national, ne prend pas en compte les éventuelles anomalies naturelles locales. La constitution d'un référentiel à l'échelle du bassin stéphanois est en cours et a pour but d'affiner les seuillages de chaque éléments, proposés pour la cartographie des sites. A terme, l'objectif de ce travail est de recueillir suffisamment de données pour (1) constituer un fond géochimique local robuste et (2) produire un indice de calcul de la contamination pour mieux gérer les délaissés urbains.

Références

- Cánovas, C. R., D. Quispe, F. Macías, B. Callejón-Leblic, A. Arias-Borrego, T. García-Barrera, et J. M. Nieto. 2023. « Potential release and bioaccessibility of metal/loids from mine wastes deposited in historical abandoned sulfide mines ». *Environmental Pollution* 316:120629. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120629>.
- Ghosh, M., et S. P. Singh. 2005. « A Comparative Study of Cadmium Phytoextraction by Accumulator and Weed Species ». *Environmental Pollution* 133(2):365-71. doi: [10.1016/j.envpol.2004.05.015](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.05.015).
- Håkanson, Lars. 1980. « An ecological risk index for aquatic pollution control.a sedimentological approach ». *Water Research* 14(8):975-1001. doi: [10.1016/0043-1354\(80\)90143-8](https://doi.org/10.1016/0043-1354(80)90143-8).
- Houba, V. J. G., E. J. M. Temminghoff, G. A. Gaikhorst, et W. van Vark. 2000. « Soil analysis procedures using 0.01 M calcium chloride as extraction reagent ». *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 31(9-10):1299-1396. doi: [10.1080/00103620009370514](https://doi.org/10.1080/00103620009370514).
- Kowalska, J. B., R. Mazurek, M. Gąsiorek, et T. Zaleski. 2018. « Pollution Indices as Useful Tools for the Comprehensive Evaluation of the Degree of Soil Contamination—A Review ». *Environmental Geochemistry and Health* 40(6):2395-2420. doi: [10.1007/s10653-018-0106-z](https://doi.org/10.1007/s10653-018-0106-z).
- ministère en charge de l'environnement. 2017. *méthodologie nationale de gestion des sites et sols pollués*.
- Müller, G. 1969. « INDEX OF GEOACCUMULATION IN SEDIMENTS OF THE RHINE RIVER. » *Geo Journal* (2(3)):108-18.
- Novozamsky, I., Th M. Lexmond, et V. J. G. Houba. 1993. « A Single Extraction Procedure of Soil for Evaluation of Uptake of Some Heavy Metals by Plants ». *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. doi: [10.1080/03067319308027610](https://doi.org/10.1080/03067319308027610).
- Pauget, B., Faure, O., Conord, C., Crini, N. & de Vaufleury, A., 2015. In situ assessment of phyto and zooavailability of trace elements: a complementary approach to chemical extraction procedures. *Science of the Total Environment*, 521-522: 400-410
- Pejman, A., G. Nabi Bidhendi, M. Ardestani, M. Saeedi, et A. Baghvand. 2015. « A new index for assessing heavy metals contamination in sediments: A case study ». *Ecological Indicators* 58:365-73. doi: [10.1016/j.ecolind.2015.06.012](https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.06.012).
- Puchoux, N., N. Manier, et O. Faure. 2021. *Identification de friches polluées éligibles à une reconversion écologique*.
- Reimann, C., P. Filzmoser, et R. G. Garrett. 2005. « Background and threshold: critical comparison of methods of determination ». *Science of The Total Environment* 346(1):1-16. doi: [10.1016/j.scitotenv.2004.11.023](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.11.023).
- Remon, E., J. L. Bouchardon, M. Le Guédard, J. J. Bessoule, C. Conord, et O. Faure. 2013. « Are Plants Useful as Accumulation Indicators of Metal Bioavailability? » *Environmental Pollution* 175:1-7. doi: [10.1016/j.envpol.2012.12.015](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.12.015).
- Scattolin, M., S. Peuble, F. Pereira, F. Paran, J. Moutte, N. Menad, et O. Faure. 2021. « Aided-phytostabilization of steel slag dumps: The key-role of pH adjustment in decreasing chromium toxicity and improving manganese, phosphorus and zinc phytoavailability ». *Journal of Hazardous Materials* 405:124225. doi: [10.1016/j.jhazmat.2020.124225](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124225).
- Sutherland, R. A. 2000. « Bed Sediment-Associated Trace Metals in an Urban Stream, Oahu, Hawaii ». *Environmental Geology* 39(6):611-27. doi: [10.1007/s002540050473](https://doi.org/10.1007/s002540050473).

Remerciements

Ce travail a été réalisé avec l'aide de l'école des mines de Saint-Etienne, France, par son financement d'un contrat doctoral et des analyses liés. R. Seillier remercie C.R. Cánovas pour son aide et accueil dans les laboratoires de l'université de Huelva, Espagne, pour la réalisation des tests de bioaccessibilité orale du sol.

Analyse multi-échelle de l'impact du lithium sur les microorganismes

Nicolas Fierling¹, Patrick Billard¹, Flavio Fornasier², Pascale Bauda³,
Damien Blaudez¹

¹ Université de Lorraine, CNRS, LIEC, F-54000 Nancy, France.

² Council for Agricultural Research and Agricultural Economy Analysis, Italie.

³ Université de Lorraine, CNRS, LIEC, F-57000 Metz, France.

Résumé

Le lithium (Li) est devenu en quelques années un métal central dans les stratégies modernes de décarbonisation. L'engouement exponentiel pour ce métal soulève des inquiétudes suite à son relargage de plus en plus important dans l'environnement. Cette étude vise à combler les manques de connaissance concernant l'impact du Li sur les organismes en étudiant la réponse d'un microorganisme modèle eucaryote (*S. cerevisiae*) ainsi que celles de communautés microbiennes telluriques. Nous avons ainsi pu identifier que les systèmes de défense reposent sur l'internalisation du Li et/ou l'export de ce métal en dehors des cellules. A l'inverse, les cibles cellulaires du Li sont majoritairement des régulateurs fonctionnels complexes, conservés chez de nombreux organismes dont l'être humain. Enfin, une analyse des communautés microbiennes a révélé une modification drastique de la diversité des bactéries, où certains genres deviennent prépondérants au détriment d'autres. De plus, en présence de fortes concentrations de Li, un déclin rapide de nombreuses activités enzymatiques, cruciales pour les cycles du carbone, de l'azote et du phosphore, a pu être observé. Ces résultats soulignent l'impact multi-échelle du Li sur les microorganismes, ce qui, *in fine*, pourrait affecter le fonctionnement biologique des sols.

Introduction

Par son importance économique, politique et industrielle, le Li est un métal stratégique, et qui est devenu prépondérant dans les objets du quotidien (principalement dans les batteries). La consommation exponentielle de Li associée à un faible taux de recyclage conduit à un relargage dans l'environnement dont l'impact sur les (micro)organismes reste peu documenté. L'objectif de cette étude est de compléter les connaissances actuelles de l'impact du Li sur les microorganismes par des approches sans *a priori* à l'échelle moléculaire, cellulaire et des communautés.

Matériel et méthodes

Par une approche de délétomique (criblage d'une banque de mutants) nous avons pu étudier les réponses liées au Li à l'échelle moléculaire et cellulaire chez *Saccharomyces cerevisiae*. L'objectif était d'identifier les cibles cellulaires et les mécanismes de résistance au Li. En parallèle, la mise en place d'une expérience en microcosmes nous a permis de tester l'influence d'une gamme de concentrations de Li (0 à 1500 ppm de Li) à l'échelle des communautés. A ce dessein, l'impact de ce métal sur les diversités fonctionnelle et microbienne des communautés bactériennes et fongiques telluriques a été étudié.

Résultats et discussion

De nombreuses fonctions sont impliquées dans la cytotoxicité et la résistance au Li. Les systèmes de transport joueraient un rôle central dans la résistance à ce métal (Figure 1). A l'inverse, des processus de phosphorylation semblent être impliqués dans la cytotoxicité au Li. Les modifications par phosphorylation peuvent réguler l'initiation de la synthèse protéique, qui peut-être délétère en présence d'un stress salin (Goossens et al., 2001; Serrano et al., 2003). Pour approfondir ces résultats, un test de spécificité au Li des fonctions identifiées a été réalisé en comparant la réponse de *S. cerevisiae* en présence d'autres métaux alcalins/alcalino-terreux (Figure 2). Il en résulte que des systèmes de régulation cellulaires complexes, comme les systèmes SAGA et NMD (nonsense-mediated mRNA decay) respectivement impliqués dans la cytotoxicité et la résistance, soient spécifiques au Li. Il est intéressant de noter que les trois mutants (UPF1, NAM7 et NMD2) uniquement sensibles au Li sont impliqués dans la même voie fonctionnelle (Figure 2). En effet, ces trois gènes interviennent dans la voie NMD impliquant la régulation de plus d'une centaine de gènes dont des transporteurs de métaux (Celik et al., 2017; Zhang and Kebaara, 2022).

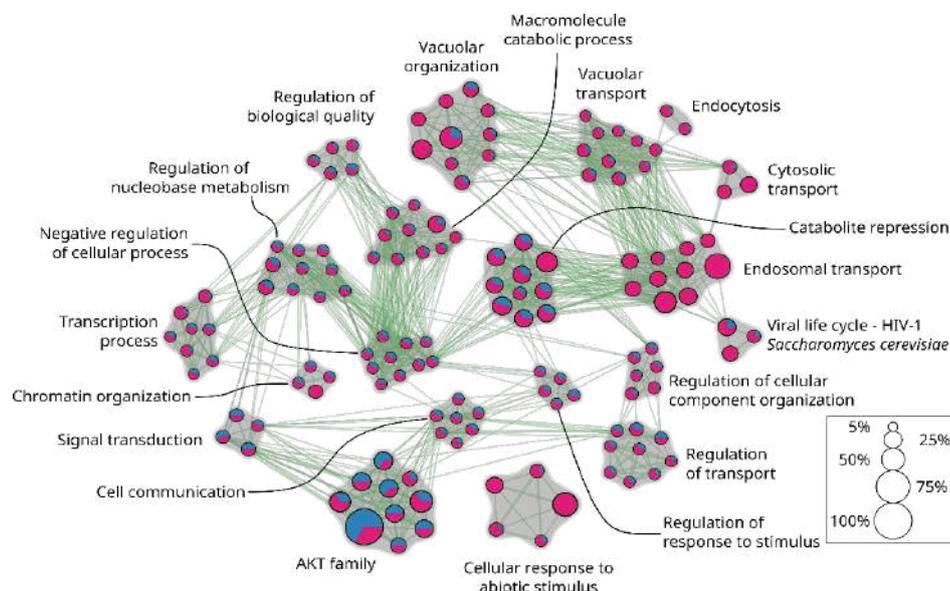


Figure 1 : Analyse d'enrichissement fonctionnel des mutants résistants et sensibles au lithium. La proportion de gènes impliquée dans les phénotypes de résistance (bleu) et de sensibilité (magenta) est représentée par des diagrammes circulaires à l'intérieur de chaque nœud (fonction). La taille de chaque nœud/groupe fonctionnel correspond au nombre de gènes trouvés dans une catégorie donnée divisé par le nombre total de gènes dans cette catégorie et exprimé en pourcentage. Les lignes vertes représentent les chevauchements de gènes entre deux fonctions.

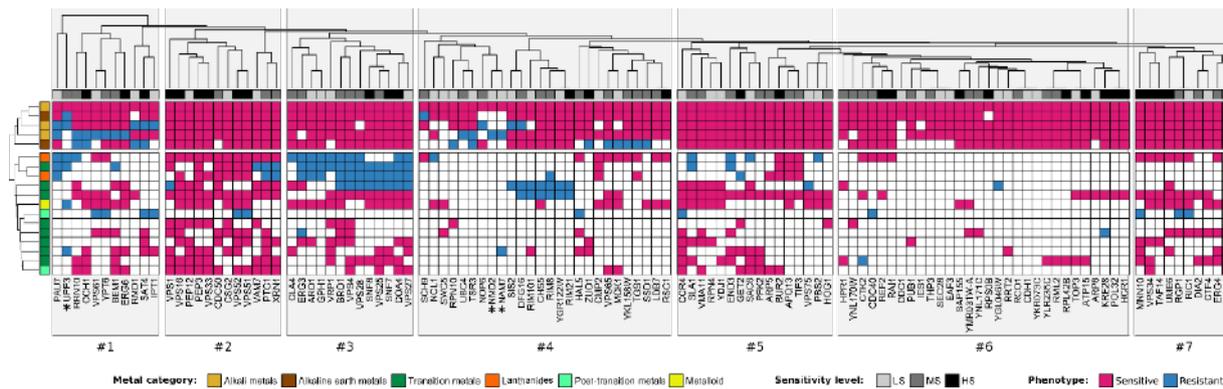


Figure 2 : Comparaison croisée des mutants sensibles au lithium et des autres métaux. L'axe des y correspond aux facteurs de stress métalliques. L'axe des x représente un regroupement hiérarchique des gènes supprimés qui confèrent un phénotype sensible au Li. Les mutants présentant un phénotype de sensibilité ou de résistance sont représentés en magenta et en bleu, respectivement. Les groupes 1 à 8 comprennent des mutants présentant un profil similaire de sensibilité ou de résistance aux métaux. Les astérisques indiquent les trois mutants spécifiquement sensibles au Li. LS : faible sensibilité ; MS : sensibilité moyenne ; HS : sensibilité élevée.

Afin d'appréhender l'impact au niveau des communautés microbiennes du sol, des analyses ont été réalisées après 7 et 28 jours d'exposition au Li. Ainsi, nous avons constaté que le Li a altéré rapidement (7 jours) les activités enzymatiques et ceci dès la plus faible concentration (Figure 3). Ce phénomène a également été reporté en présence de Na et Ca (Frankenberger and Bingham, 1982; Ghollara and Raiesi, 2007; Sritongon et al., 2022; Yang et al., 2020).

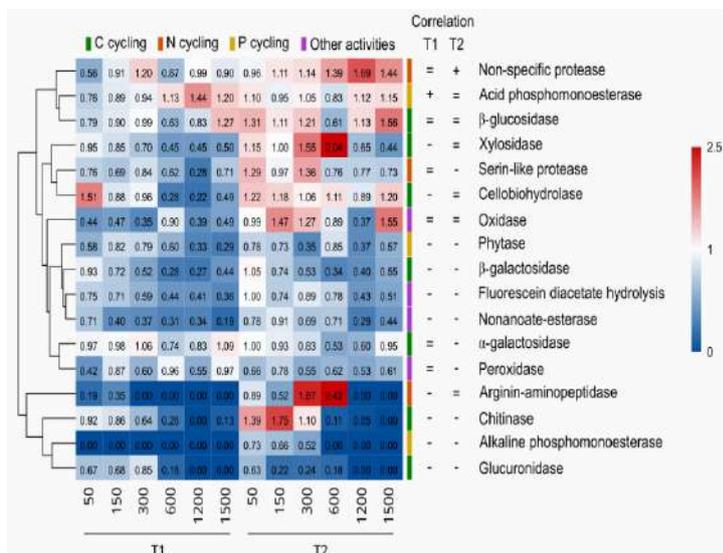


Figure 3 : Activités enzymatiques relatives dans le sol le long d'un gradient de contamination au Li après 7 jours (T1) et 28 jours (T2). L'axe des x correspond aux différentes concentrations de Li. Les activités relatives inférieures et supérieures par rapport à la condition de contrôle sont indiquées en bleu et en rouge, respectivement. Les résultats de la corrélation de Spearman (-, négatif ; +, positif ; =, non corrélé) de activités en fonction du gradient de Li sont reportés dans la colonne de corrélation pour les deux temps d'exposition.

La diversité taxonomique a également été influencée par le gradient de Li. Une analyse par métabarcoding a révélé que certains genres sont plus abondants et d'autres sont moins présents en fonction des concentrations (Figures 4A et B). Les champignons sont majoritairement représentés tout le long du gradient par le genre *Umbelopsis* (Mucoromycota) (Figure 4A). C'est un phylum communément retrouvé dans les sols mais rare, voire absent, en condition saline (Mohamed and Martiny, 2011; Yang et al., 2020). L'impact du gradient a été particulièrement marqué pour les bactéries, où le genre *Alicyclobacillus*, peu représenté à 0 ppm devient majoritaire à 1500 ppm (abondance relative supérieure à 75%, Figure 4B). C'est un genre appartenant aux Firmicutes, un phylum ubiquiste souvent utilisé comme indicateur du stress abiotique dans les sols (Garbeva et al., 2003; Han et al., 2014). La grande majorité des espèces de ce genre ont la particularité de posséder des acides gras et des glycolipides particuliers qui peuvent contribuer à la résistance à différents stress (Ciuffreda et al., 2015; Wisotzkey et al., 1992).

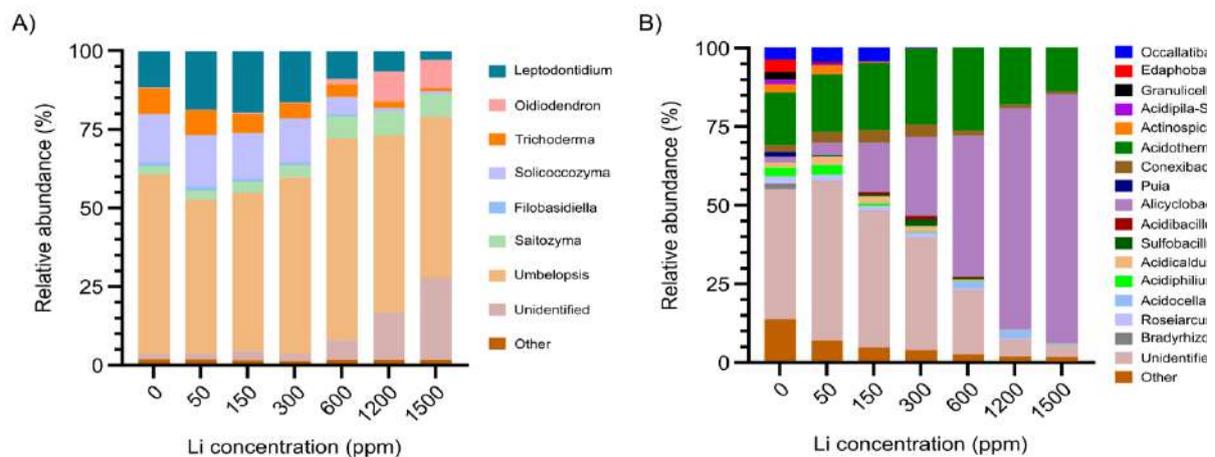


Figure 4 : Composition taxonomique et abondance relative des genres fongiques (A) et bactériens (B) le long d'un gradient de contamination par le Li. Les genres les plus abondants (>1%) sont représentés et la diversité restante a été catégorisée comme Autre ou Non identifiée pour les taxons multi ou non affiliés. Les valeurs sont la moyenne de quatre répétitions indépendantes par concentration.

Conclusions et Perspectives

Ces différentes approches nous ont ainsi permis de (i) révéler les réponses moléculaires et cellulaires liées à une contamination au Li chez un organisme modèle, (ii) de montrer que ce métal émergent affecte à la fois la diversité fonctionnelle et taxonomique microbienne du sol, ce qui pourrait à terme influencer la disponibilité des ressources azotées, carbonées ou phosphorées pour les autres organismes, (iii) d'identifier de potentiels biomarqueurs et/ou bioindicateurs d'une contamination au Li par l'intermédiaire des tests de spécificité métallique.

Références

- Celik, A., et al., 2017. High-resolution profiling of NMD targets in yeast reveals translational fidelity as a basis for substrate selection. *RNA N. Y. N* 23, 735–748.
- Ciuffreda, E., et al., 2015. *Alicyclobacillus* spp.: New Insights on Ecology and Preserving Food Quality through New Approaches. *Microorganisms* 3, 625–640.
- Frankenberger, W.T., Bingham, F.T., 1982. Influence of Salinity on Soil Enzyme Activities. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46, 1173–1177.
- Garbeva, P., van Veen, J.A., van Elsas, J.D., 2003. Predominant *Bacillus* spp. in Agricultural Soil under Different Management Regimes Detected via PCR-DGGE. *Microb. Ecol.* 45, 302–316.
- Ghollarata, M., Raiesi, F., 2007. The adverse effects of soil salinization on the growth of *Trifolium alexandrinum* L. and associated microbial and biochemical properties in a soil from Iran. *Soil Biol. Biochem.* 39, 1699–1702.
- Goossens, A., et al., 2001. The Protein Kinase Gcn2p Mediates Sodium Toxicity in Yeast*. *J. Biol. Chem.* 276, 30753–30760.
- Han, Q.-Q., et al., 2014. Beneficial soil bacterium *Bacillus subtilis* (GB03) augments salt tolerance of white clover. *Front. Plant Sci.* 5.
- Hippchen, B., Röhl, A., Poralla, K., 1981. Occurrence in soil of thermo-acidophilic bacilli possessing ω -cyclohexane fatty acids and hopanoids. *Arch. Microbiol.* 129, 53–55.
- Mohamed, D.J., Martiny, J.B.H., 2011. Patterns of fungal diversity and composition along a salinity gradient. *ISME J.* 5, 379–388.
- Serrano, R., et al., 2003. Salt Stress Proteins Identified by a Functional Approach in Yeast. *Monatshefte Für Chem. Chem. Mon.* 134, 1445–1464.
- Sritongon, N., et al., 2022. The effect of salinity on soil chemical characteristics, enzyme activity and bacterial community composition in rice rhizospheres in Northeastern Thailand. *Sci. Rep.* 12, 20360.
- Wisotzkey, J.D., et al., 1992. Comparative Sequence Analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and Proposal for Creation of a New Genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 263–269.
- Yang, C., et al., 2020. Assessing the effect of soil salinization on soil microbial respiration and diversities under incubation conditions. *Appl. Soil Ecol.* 155, 103671.
- Zhang, Q., et al., 2018. Soil microbial activity and community structure as affected by exposure to chloride and chloride-sulfate salts. *J. Arid Land* 10, 737–749.
- Zhang, X., Kebaara, B.W., 2022. Nonsense-mediated mRNA decay and metal ion homeostasis and detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. *BioMetals* 35, 1145–1156.

Remerciements

Nous remercions le LabEx Ressources 21 pour le financement de la thèse de NF et des travaux associés, et le pôle de compétences en chimie analytique, ANATELo (LIEC), pour les analyses ICP-MS. Ce travail est inclus dans le programme scientifique du consortium de recherche GISFI (Groupe d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles).