

**SYNTHESE / EXTENDED ABSTRACT**  
FRANÇAIS / ENGLISH

**BIODISPONIBILITE ET BIOACCESSIBILITE DES POLLUANTS  
DANS LE CAS DES SOLS POLLUES.  
ETAT DES CONNAISSANCES ET PISTES DE RECHERCHE**

**BIOAVAILABILITY AND BIOACCESSIBILITY OF SOIL  
CONTAMINANTS  
STATE OF THE ART AND RESEARCH PERSPECTIVES**

janvier 2012

**C. DABIN, A. GUIGONNET-SERGENT - ICF Environnement**  
**E. ALGROS, A.-M. CHARISSOU – IPL SEDE**

Créée en 1989 à l'initiative du Ministère en charge de l'Environnement, l'association RECORD – REseau COopératif de Recherche sur les Déchets – est le fruit d'une triple coopération entre industriels, pouvoirs publics et chercheurs. L'objectif principal de RECORD est le financement et la réalisation d'études et de recherches dans le domaine des déchets et des pollutions industrielles. Les membres de ce réseau (groupes industriels et organismes publics) définissent collégialement des programmes d'études et de recherche adaptés à leurs besoins. Ces programmes sont ensuite confiés à des laboratoires publics ou privés.

- ✓ En Bibliographie, le document dont est issue cette synthèse sera cité sous la référence :  
**RECORD**, Biodisponibilité et Bioaccessibilité des polluants dans le cas des sols pollués. Etat des connaissances et pistes de recherche, 2012, 259 p, n°10-0671/1A
- ✓ Ces travaux ont reçu le soutien de l'ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie)  
[www.ademe.fr](http://www.ademe.fr)

## **RESUME**

Dans le cadre de la gestion des sols pollués, et notamment dans les évaluations quantitatives des risques sanitaires (EQRS), une des voies d'exposition étudiée est l'ingestion de sol. Actuellement, les évaluations de risque sanitaire considèrent, de façon sécuritaire, que la totalité d'une substance présente dans un sol ingéré par un individu, atteindra ses organes cibles et générera un effet toxique. Or, seule une fraction de la quantité ingérée atteint réellement la circulation sanguine (notion de biodisponibilité) et les organes cibles. Il s'agit donc d'étudier le facteur correctif à mettre en œuvre dans le calcul de la dose d'exposition afin de tenir compte des variations de la relation dose-effet associée à la matrice sol étudiée.

Des travaux de recherche sont actuellement menés afin d'approcher la valeur de biodisponibilité par des tests in vitro de bioaccessibilité, moins coûteux à mettre en place que les tests in vivo de biodisponibilité. La bioaccessibilité correspond à la fraction de la quantité ingérée qui, après dissolution, est disponible à l'absorption.

La présente étude clarifie les définitions de la biodisponibilité et la bioaccessibilité. Dans le cadre de l'ingestion de sol pollué par l'Homme, un état des connaissances internationales est dressé : utilisation

actuelle de ces notions dans la gestion des sites et sols pollués, investigations à mener, analyse (caractéristiques des différents tests in vitro de bioaccessibilité, comparatif,...), résultats de bioaccessibilité, modélisation de la biodisponibilité, méthodologie pour l'intégration de ces notions dans les études à visée sanitaire. Enfin, un bilan est présenté afin de proposer une méthode d'intégration de ces paramètres dans les EQRS en France.

## **MOTS CLES**

Bioaccessibilité, ingestion, sol, test in vitro, facteur d'absorption relatif, évaluation des risques sanitaires.

-----

## **ABSTRACT**

Within the framework of the management of contaminated soils, and notably in quantitative health risk assessments (QHRA), ingestion is one of the exposure pathway studied. At present, as a margin of safety, 100% of the substance in the ingested soil is considered to reach the target organ and to have toxic effects. However, only a fraction of the total quantity ingested actually enters the bloodstream (bioavailability) and reaches the target organs. The correction term to be used when calculating the exposure dose must therefore be studied in order to take into account variations in the dose-effect relationship associated with the matrix.

Research is currently being done to estimate bioavailability using in vitro bioaccessibility tests – less expensive and easier to carry out than in vivo bioavailability tests. Bioaccessibility is the fraction of an ingested compound that is soluble in the gastrointestinal tract and can then be absorbed.

This study clarifies the definitions of bioavailability and bioaccessibility. The present state of international knowledge concerning the human ingestion of soil is reviewed. This includes the current use of these notions in contaminated site and soil management, the investigations to be carried out, analysis and comparison of the various in vitro bioaccessibility tests, bioaccessibility results, bioavailability models, and methodology for incorporating these notions in health studies. These findings are summarised and a method is proposed for integrating bioavailability/bioaccessibility in QHRA in France.

## **KEY WORDS**

Bioaccessibility, soil ingestion, in vitro test, relative absorption factor, human health risk assessment.

## Contexte et objectif

Actuellement, les évaluations de risque considèrent, de façon sécuritaire, que la totalité d'une substance présente dans un sol ingérée par un individu, atteindra ses organes cibles et générera un effet toxique. Cependant, plusieurs études sur les animaux suggèrent que seule une fraction des substances présentes dans un sol parvient dans le sang, puis au niveau de l'organe cible. En effet, la matrice ingérée, qui véhicule la substance toxique, a une importance fondamentale dans la relation dose-effet de la substance étudiée. Il s'agit donc d'étudier le facteur correctif à mettre en œuvre dans le calcul de la dose d'exposition afin de tenir compte des variations de la relation dose-effet entre la matrice étudiée (sol) et la matrice de référence dont sont issues les valeurs toxicologiques de référence.

Ce facteur correctif se fonde sur deux éléments :

- ✓ la bioaccessibilité, définie comme la fraction de la dose administrée solubilisée dans le tractus gastro-intestinal et disponible à l'absorption,
- ✓ la biodisponibilité orale, définie comme la fraction de la dose administrée parvenant dans le compartiment sanguin.

Intégrer, sous forme d'un facteur correctif de la dose d'exposition, les notions de bioaccessibilité et/ou biodisponibilité dans les évaluations de risque permettrait d'étudier de façon plus pertinente le danger réel des substances présentes dans les sols d'anciens sites industriels.

C'est dans cet objectif qu'ICF Environnement et IPL SED Est ont réalisé cette étude visant plus spécifiquement à :

- clarifier ces notions de biodisponibilité et bioaccessibilité dans le cadre de l'ingestion de sol pollué par l'Homme,
- dresser un état des connaissances internationales concernant leur utilisation actuelle dans la gestion des sites et sols pollués, en termes d'investigations à mener, analyses réalisées (caractéristiques des différents tests *in vitro* de bioaccessibilité, comparatif,...), résultats de bioaccessibilité, modélisation de la biodisponibilité, méthodologie pour l'intégration de ces notions dans les études à visée sanitaire
- proposer une méthodologie d'intégration de ces paramètres dans les EQRS en France (en termes d'analyses et de méthodologie).

## Notions de biodisponibilité et bioaccessibilité : définitions et utilisations actuelles

Ces notions peuvent prendre plusieurs sens selon le contexte auquel elles sont rattachées. Dans cette étude, seule la voie d'exposition directe de l'Homme par ingestion de sol est prise en compte.

La fraction bioaccessible, ou bioaccessibilité orale *absolue* d'un polluant présent dans une matrice (ex : nourriture, sol, eau etc.), est alors définie comme la fraction de ce polluant qui est extraite de cette matrice, et mise en solution par la salive et par les fluides digestifs, dans le tractus gastro-intestinal.

La fraction biodisponible, ou biodisponibilité orale *absolue* d'un polluant présent dans une matrice (ex : nourriture, sol, eau etc.), est la fraction de ce polluant qui atteint la circulation sanguine (circulation systémique).

Il apparaît une relation entre la biodisponibilité et la bioaccessibilité. En effet, la biodisponibilité résulte de trois phénomènes successifs :

- ✓ la dissolution de la substance dans la salive, les sucs stomacaux et intestinaux (correspondant à la fraction bioaccessible),
- ✓ l'absorption à travers l'épithélium intestinal,
- ✓ la métabolisation hépatique.

Les bioaccessibilité et biodisponibilité *relatives* ont, quant à elles, pour objectif de comparer l'extraction d'une substance présente sous deux formes/spéciations chimiques différentes, ou celle d'une même substance sous la même forme dans deux matrices différentes. Cette notion de relativité est importante dans la détermination du facteur correctif (comparaison entre la matrice sol et la matrice de référence de l'étude toxicologique).

En pratique, l'US-EPA est la seule agence gouvernementale ayant officiellement validé un test *in vitro* en l'occurrence pour un élément inorganique : le plomb, et ceci en vue d'intégrer les notions de bioaccessibilité dans les évaluations de risque sanitaire. On notera d'une manière générale que les données disponibles de bioaccessibilité concernent essentiellement les éléments traces métalliques.

Des travaux de recherche sont actuellement en cours au niveau Européen (BARGE<sup>1</sup>), au Canada (BARC<sup>2</sup>) et aux USA (SRBC<sup>3</sup>) en vue d'approfondir les connaissances sur la bioaccessibilité ou biodisponibilité des polluants inorganiques et de développer celles sur les polluants organiques, notamment sur les paramètres expérimentaux à appliquer et sur la validation de la représentativité physiologique des tests de bioaccessibilité.

## Etat des connaissances

### Analyse

Deux catégories d'essais existent : les essais *in vivo* permettant de mesurer la fraction biodisponible et les essais *in vitro* permettant de mesurer la fraction bioaccessible et donc d'approcher la biodisponibilité. Cette étude a été axée essentiellement sur les essais *in vitro* de bioaccessibilité. Les essais *in vitro* moins longs et moins onéreux à mettre en œuvre que les tests *in vivo*, mais également ayant moins de contraintes éthiques, apparaissent en effet comme les essais les plus susceptibles de se développer dans les études à venir.

Le principe de ces tests *in vitro* est de mimer les conditions physiologiques se déroulant dans le corps humain lors de l'ingestion et des processus digestifs. La recherche bibliographique effectuée a permis de recenser différents essais physiologiques *in vitro* (se déroulant à 37°C) dont :

- ✓ des essais physiologiques simples ne simulant que la phase gastrique et utilisant peu de réactifs (HCl, glycine, phosphate),
- ✓ des essais physiologiques avec analogues gastro-intestinaux (ex : enzymes, sels biliaires) simulant au moins deux phases digestives (gastrique et intestinale).

Ces essais de bioaccessibilité varient selon :

- les segments physiologiques étudiés, pH et temps de résidence appliqués,
- la composition des solutions digestives employées,
- le protocole expérimental (type et vitesse d'agitation, la température (en général 37°C), les conditions aérobies ou anaérobies, le ratio liquide/solide (le plus souvent 100/1), l'ajout ou non de nourriture, le type de verrerie utilisée).

L'inclusion d'un plus grand nombre de compartiments physiologiques et l'ajustement des temps de résidence ont toujours pour objectif de mieux représenter les conditions physiologiques.

L'étude de la bibliographie a permis de mettre en évidence une grande disparité des résultats pour un même polluant (voire matrice), celle-ci étant, en partie, liée aux différences de conditions opératoires entre les essais employés :

- pour les éléments inorganiques, le pH est le paramètre principal qui expliquerait d'une part les différences de bioaccessibilité gastrique observées entre les essais employant des pH stomacaux différents, et d'autre part les différences mises en évidence entre les compartiments gastrique et intestinal au sein d'un même essai),
- pour les éléments organiques à tendance lipophile, la composition des solutions intestinales a probablement un rôle majeur sur leur solubilisation. En effet à l'inverse des molécules inorganiques (et notamment pour les composés cationiques, tels que le plomb, qui semblent subir des phénomènes de précipitation et complexation à pH intestinal), il apparaît que la bioaccessibilité des molécules organiques, telles que les HAP, serait plus élevée dans le segment intestinal que dans le segment gastrique,
- la présence d'aliments semble augmenter la bioaccessibilité des molécules organiques (car elle permet une meilleure solubilisation), tandis que son influence apparaît variable pour les composés inorganiques.

---

<sup>1</sup> BARGE : the Bioaccessibility Research Group of Europe ;

<sup>2</sup> BARC : Bioaccessibility Research Canada

<sup>3</sup> SBRC : Solubility/Bioavailability Research Consortium

Quel que soit le test *in vitro* de bioaccessibilité retenu, le degré de représentativité physiologique de ce test avec les conditions opératoires qui lui sont propres, doit être évalué. Ainsi, les essais *in vitro* doivent être confrontés à des essais de biodisponibilité *in vivo*. Il s'agit de démontrer qu'il existe une corrélation linéaire suffisamment robuste permettant d'estimer la biodisponibilité d'une substance à partir d'une mesure de sa bioaccessibilité dans des solutions simulant les liquides biologiques.

Pour juger de la robustesse de la corrélation, certains auteurs ont déterminé des critères de validité qui sont :

- corrélation linéaire statistiquement significative avec  $r^2 > 0,6$ ,
- gamme suffisamment large de valeurs de biodisponibilité testées (intervalle d'environ 70 % entre la valeur minimale et la valeur maximale), ceci devant permettre de valider la corrélation pour divers types de sols, autorisant ainsi, en théorie, l'utilisation du test quel que soit le site étudié ;
- bonne répartition des valeurs de biodisponibilité dans la gamme.

De plus, comme tout test expérimental, les tests *in vitro* de bioaccessibilité doivent être valides en termes de répétabilité et reproductibilité. Les critères retrouvés dans la littérature sont :

- répétabilité intra-laboratoire (RSD ou CV<sup>4</sup>) < 10 %,
- reproductibilité inter-laboratoire (RSD ou CV) < 20 %.

### **Résultats des tests**

Les résultats des tests disponibles dans la littérature sont très variables. Dans les cas extrêmes, par exemple pour le plomb, tous tests et sols étudiés confondus, la bioaccessibilité varie de 0,5 à 95 %.

En effet, comme déjà souligné, les résultats d'une mesure de bioaccessibilité fluctuent en fonction du test de mesure utilisé. Ils varient également en fonction des caractéristiques du sol considéré (pH, contenu en matière organique) et de la substance étudiée (spéciation des substances inorganiques<sup>5</sup> / caractéristiques physico-chimiques des molécules organiques). L'interdépendance de ces trois éléments rend l'interprétation des résultats et leur comparaison extrêmement complexes et, accentue la nécessaire spécificité de la mesure de bioaccessibilité au regard du site et de la problématique étudiés.

Enfin, au vu des droites de corrélations *in vivo* / *in vitro* établies dans la bibliographie, et des résultats de bioaccessibilité obtenus lors de tests inter-laboratoires (tels que ceux menés par le groupe BARC), il apparaît que, dans une proportion non négligeable de cas (45 %), les résultats fournis par les essais *in vitro* (mesurant la bioaccessibilité) sont inférieurs aux résultats *in vivo* (mesurant la biodisponibilité), alors qu'il était, en théorie, attendu l'inverse.

L'emploi d'un résultat brut de bioaccessibilité issu d'un test *in vitro* (quel qu'il soit) semble donc devoir se faire avec une grande prudence scientifique, du fait d'une potentielle sous-estimation de la biodisponibilité. Toutefois si des corrélations ont été démontrées, le recours à la modélisation peut apporter des réponses dans certaines situations.

### **Modélisations**

Les tests *in vitro* permettent donc d'obtenir une valeur de bioaccessibilité, mais, comme mentionné précédemment, le facteur correctif le plus adéquat à intégrer dans les calculs de risque est la biodisponibilité relative.

La valeur de biodisponibilité relative peut être obtenue selon différents moyens :

- directement par la réalisation de test *in vivo* (le plus souvent chez l'animal), cependant pour diverses raisons (éthiques, techniques, financières, etc.), ces tests sont difficiles à mettre en œuvre ;

---

<sup>4</sup> RSD : Relative Standard Deviation ; CV : Coefficient de variation

<sup>5</sup> Il s'agit ici de « spéciation » au sens large du terme, c'est-à-dire la répartition des éléments traces métalliques entre les diverses phases solides constitutives du sol. Il s'agit d'une définition opérationnelle de la spéciation, et non physico-chimique comme c'est le cas dans la définition au sens strict du terme. Cette spéciation peut être obtenue, entre autre, par la méthode chimique des extractions séquentielles.

- indirectement à partir d'autres paramètres d'entrée tels que ceux sous-tendant la disponibilité environnementale<sup>6</sup> de la substance. Pour les substances inorganiques, deux courants se dégagent, une modélisation de la bioaccessibilité à partir des propriétés physico-chimiques du sol, et une autre à partir de la répartition de la substance entre les diverses phases solides constitutives du sol (obtenue *via* des extractions séquentielles). Néanmoins, à l'heure actuelle, les données disponibles, et les équations de corrélation associées, sont très peu nombreuses. En outre, il faut souligner que, dans la grande majorité des cas, les éléments de la disponibilité environnementale d'une substance (caractéristiques des sols et de la substance) ne permettent pas d'estimer directement sa biodisponibilité (mais sa bioaccessibilité). Une étape supplémentaire de modélisation sera alors nécessaire pour l'estimation de la biodisponibilité de la substance, engendrant ainsi des incertitudes supplémentaires ;
- indirectement *via* la mise en œuvre de mesures *in vitro* de bioaccessibilité qui ont l'intérêt de limiter les coûts et délais associés aux mesures *in vivo*, en s'assurant d'une bonne corrélation entre les mesures *in vitro* et *in vivo* (selon les critères de corrélation cités précédemment). Les équations de corrélation *in vivo/in vitro* apparaissent comme la méthode la plus fiable pour modéliser la biodisponibilité relative d'un contaminant. Néanmoins, compte tenu de la variabilité des équations obtenues, il est essentiel d'avoir à l'esprit que ces estimations demeurent empreintes d'incertitudes. Ainsi, et dans une démarche sécuritaire, l'équation engendrant une valeur de biodisponibilité relative la plus élevée peut être privilégiée. Par ailleurs, plusieurs droites de corrélation pouvant être obtenues selon que l'on utilise les données issues de la phase gastrique ou celles de la phase gastro-intestinale, la phase montrant la meilleure corrélation avec les données *in vivo* est à privilégier.

Actuellement, il existe relativement peu d'équations de corrélation dans la littérature scientifique, notamment pour un même test et une même substance, ce qui limite l'analyse critique des équations disponibles.

## **Etude**

Dans le contexte d'une évaluation des risques sanitaires associés à l'ingestion de sol, la biodisponibilité *relative* (ou FAR) est le facteur qui permet d'ajuster de façon pertinente le calcul de la dose d'exposition en fonction de la matrice « sol » étudiée. La biodisponibilité relative devrait être établie au regard de la matrice de référence, c'est-à-dire celle utilisée dans l'étude clé ayant permis l'élaboration de la Valeur Toxicologique de Référence (VTR).

Plusieurs démarches itératives ont été rencontrées dans la littérature. Les méthodes proposées concernent essentiellement les métaux et métalloïdes, les composés organiques sont encore peu étudiés.

Dans ces démarches, la pertinence de mettre en place une étude de bioaccessibilité est toujours étudiée dans un premier temps. Une fois que l'étude de la biodisponibilité/bioaccessibilité est privilégiée, la détermination du FAR se fait de manières différentes selon les auteurs.

Certains auteurs utilisent directement des données de biodisponibilité ou bioaccessibilité issues de la bibliographie.

D'autres auteurs (RIVM, INERIS) se fondent sur une donnée de bioaccessibilité absolue directement issue du test physiologique mené en laboratoire, et calculent eux-mêmes le FAR de façon théorique. Ces équations théoriques sont basées sur des simplifications de la relation entre la biodisponibilité et la bioaccessibilité, en termes d'absorption et/ou métabolisation.

Enfin, d'autres auteurs utilisent les mesures de bioaccessibilité et intègre le résultat dans l'équation de corrélation *in vivo/in vitro* associé au test *in vitro*.

---

<sup>6</sup> Selon la norme EN ISO 17402 (2011), la disponibilité environnementale est « la fraction du contaminant potentiellement disponible pour des organismes et qui résulte des processus physico-chimiques de désorption »

## Bilan et propositions

### *Analyse de la bioaccessibilité*

D'après les critères de pertinence du protocole (faisabilité technique, représentativité physiologique) et des résultats (corrélation des résultats *in vitro* et *in vivo*), ainsi que des critères de répétabilité et reproductibilité, le test européen UBM et les essais qui en sont proches (RIVM avec ou sans nourriture et FOREhST) semblent être les essais les plus satisfaisants.

Malgré cela, des travaux de recherche et acquisition de connaissances doivent être poursuivis afin d'améliorer les performances de ces protocoles. Il semble, en effet, nécessaire de consolider les modes opératoires afin de s'approcher aux mieux des résultats de biodisponibilité *in vivo*, et de vérifier pour quels polluants ils peuvent être plus spécifiquement employés, éventuellement pour quels sols, et selon quelle(s) phase(s) (gastrique ou gastro-intestinale).

Il faut également souligner que le test RBALP (test physiologique simple) reste le test de choix aux Etats-Unis pour estimer la bioaccessibilité du plomb dans les sols. Il est également en cours de validation pour l'arsenic. En effet, des auteurs ont validé cet essai en estimant que l'erreur qu'il fournit est de 20%. A noter toutefois que, malgré sa simplicité (phase gastrique uniquement), il nécessite un appareillage lourd (verrerie de volume important à placer dans un bain thermostaté avec système de rotation).

D'autres procédures simples, avec ou sans mise en conditions physiologiques, semblent pouvoir également émerger au regard des résultats obtenus pour le plomb et l'arsenic dans l'étude BARC de 2011. En effet, ces procédures ont fourni (pour un sol de référence) des valeurs plus proches (ou plus élevées, donc plus sécuritaires) que les tests plus complexes. Toutefois, ces procédures ont été largement moins étudiées et n'ont en particulier pas fait l'objet de travaux de comparaison/corrélation *in vitro/in vivo* intégrant plusieurs sols, ce qui représente une étape fondamentale de validation d'un test.

D'une façon générale, si les tests deviennent plus répétables et reproductibles, il est possible que les corrélations mises en évidence s'améliorent également et ne souffrent plus de certains biais.

De plus, suite à cet état de l'art, des préconisations générales pour la réalisation de tests *in vitro* peuvent être émises :

- la verrerie et le pré-traitement des échantillons devront être adaptés en fonction de la nature des polluants étudiés ;
- un certain nombre de réplicats devront être menés au sein du laboratoire ;
- il peut être envisagé de conduire des essais avec des ratios L/S (liquide / solide) plus élevés que ceux utilisés dans les protocoles de base ;
- il sera impératif de contrôler le pH en fin de phase gastrique, voire de l'ajuster (ces deux derniers points pouvant permettre d'améliorer les performances des essais et ainsi leurs résultats au regard des données *in vivo*) ;
- il peut être intéressant de réaliser des réplicats avec et sans ajout d'aliment pour étudier la bioaccessibilité des éléments inorganiques. Pour les molécules organiques, l'ajout d'aliment semble impératif ;
- l'utilisation systématique de sol(s) de référence est à préconiser pour valider les séries d'analyses ;
- il faudra également s'assurer que la mesure des teneurs totales soit réalisée sur la même fraction que celle utilisée pour les tests de bioaccessibilité (<250 µm en général).

### *Méthodologie d'intégration dans l'évaluation des risques sanitaires*

La meilleure estimation du FAR est obtenue à partir des résultats des tests *in vitro* de bioaccessibilité, préférentiellement selon le test UBM et les essais qui en sont proches (RIVM avec ou sans nourriture et FOREhST). Ces tests permettent en effet une grande spécificité de la mesure au regard du site étudié, et de modélisations relativement robustes permettant d'estimer la biodisponibilité du(des) contaminant(s) étudié(s).

Un logigramme a été établi en vue de synthétiser et d'articuler les différentes méthodes d'intégration du FAR dans les évaluations de risque sanitaire. Certaines étapes sont actuellement sujettes à incertitude. En effet, ce logigramme est établi en l'état actuel des connaissances et devra être adapté à mesure de l'avancée des nouvelles recherches.

L'étude du logigramme constitue en elle-même un préalable à la démarche, ceci afin d'avoir une vue d'ensemble et de mieux orienter les réflexions, notamment au moment des investigations.

La première étape du logigramme (retrouvée également dans la majorité des publications étudiées) consiste à déterminer la pertinence de conduire une étude de bioaccessibilité spécifique au site. Elle permet d'écartier d'emblée les situations pour lesquelles l'utilisation de la bioaccessibilité en vue d'estimer un risque n'apportera aucun avantage majeur (voie prépondérante par inhalation, risque dispersé par exemple).

L'introduction des notions de bioaccessibilité et biodisponibilité n'engendre pas fondamentalement de changement dans les étapes de diagnostic (initial et approfondi), par rapport à ce qui est actuellement fait en pratique. Néanmoins, il faut souligner deux recommandations : éviter les échantillons composites, et, le cas échéant, rechercher des informations relatives aux formes et spéciations des éléments inorganiques en présence, par exemple, grâce à des extractions séquentielles.

Deux questions importantes se posent ensuite :

- les délais et les coûts engendrés par la prise en compte de la bioaccessibilité se justifient-ils comparativement aux coûts de réhabilitation estimés *a priori* ?
- existe-t-il un test de bioaccessibilité *in vitro* validé *in vivo* pour le traceur de risque étudié ?

Si les réponses à ces questions sont positives, le FAR pourra être intégré dans l'étude principale de l'EQRS dans les trois situations suivantes :

- lorsque les modèles expérimentaux et les matrices de référence seront identiques ou similaires entre l'étude *in vivo* et l'étude toxicologique, alors les équations de corrélation robustes pourront être utilisées directement →  $FAR \approx BD_{rel}$  ;
- si les modèles/matrices sont différents mais que la biodisponibilité dans la matrice de l'étude toxicologique est connue dans la bibliographie, FAR pourra être estimé à partir de cette dernière et du résultat brut de bioaccessibilité (à condition de prouver qu'il n'est pas sous-estimé). Ainsi, sous l'hypothèse sécuritaire d'une absorption égale à 100% et d'une absence de métabolisation →  $FAR = BA_{sol}/BD_{VTR}$  ;
- si les modèles/matrices sont différents, et que la biodisponibilité dans la matrice de l'étude toxicologique n'est pas connue dans la bibliographie, il est envisageable de réaliser, en parallèle, un test de bioaccessibilité sur le sol à l'étude et sur la matrice de l'étude toxicologique. Ainsi, sous l'hypothèse que l'absorption et la métabolisation sont des phénomènes indépendants de la matrice →  $FAR = BA_{sol}/BA_{VTR}$ . Cette situation permet notamment de s'affranchir de biais expérimentaux.

Dans ces trois cas, les mesures de gestion seront directement dépendantes du résultat du calcul de risque intégrant le FAR. Dans les cas non compatibles avec les trois situations précédentes, c'est-à-dire en cas de sous-estimation potentielle du FAR, son intégration dans l'EQRS pourra être réalisée en analyse d'incertitude. Le calcul de risque n'intégrera donc pas d'emblée le FAR, et l'établissement des mesures de gestion nécessitera alors une discussion avec tous les intervenants du projet (client, administrations,...).

**L'application de cette démarche a conduit aux résultats suivants :**

- **pour arsenic et cadmium, la bioaccessibilité peut être intégrée directement dans l'étude principale de l'EQRS ( $BD_{rel} = FAR$ ) ;**
- **pour le plomb, il est conseillé d'étudier l'introduction du FAR en analyse d'incertitude de l'EQRS ;**
- **pour l'antimoine, et les HAP (ou toute autre substance), les données étant insuffisantes, aucune méthode n'apparaît assez sécuritaire à ce stade.**

## Conclusion

Afin d'ajuster les calculs de risque, et de tenir compte du fait, qu'en réalité, seule une fraction de la dose ingérée d'un contaminant, variable selon le composé, atteint effectivement la circulation sanguine (et les organes cibles), il a été proposé d'intégrer les notions de biodisponibilité et/ou bioaccessibilité aux EQRS.

Dans le contexte d'une évaluation des risques sanitaires associés à l'ingestion de sol, la biodisponibilité *relative* (ou FAR) est le facteur qui permet d'ajuster de façon pertinente le calcul de la dose d'exposition des cibles à l'étude.

A l'heure actuelle, la meilleure estimation du FAR est obtenue à partir des résultats des tests *in vitro* de bioaccessibilité.

A l'issue de cette étude, il apparaît que le test *in vitro* UBM et ceux qui en sont proches (RIVM et FOREhST) se distinguent des autres par leur représentativité physiologique (en termes de protocole et de résultat) et par la relative facilité de mise en oeuvre de leur protocole (temps, matériel, etc.). Néanmoins, il faut souligner que certains tests simples comme SBRC/RBALP ont également montré des résultats probants et ont, à ce titre, été approuvés par certains organismes (US-EPA).

Un logigramme d'action relatif à l'intégration de FAR dans les EQRS est proposé. Deux situations se présentent :

- si la matrice et le modèle expérimental de l'étude de corrélation *in vivo/in vitro* sont identiques ou similaires à ceux de l'étude toxicologique (associée à la VTR), l'équation de corrélation (issue de la validation *in vivo/ in vitro* du test) peut être utilisée directement pour calculer le FAR,
- dans le cas contraire, le FAR sera estimé *via* l'utilisation du résultat brut de bioaccessibilité (issu du test *in vitro*), sous réserve de rester sécuritaire (évaluation de la sous-estimation potentielle du FAR).

L'intégration des notions de bioaccessibilité et biodisponibilité dans une EQRS pourra être réalisée selon deux approches :

- soit il est possible d'utiliser la bioaccessibilité dans l'étude principale de l'EQRS du fait d'une valeur de FAR jugée représentative et/ou sécuritaire. Dans ce cas, les mesures de gestion seront directement dépendantes du résultat du calcul de risque intégrant le FAR ;
- soit, du fait de certaines incertitudes persistantes (notamment vis-à-vis d'une sous-estimation potentielle du FAR), la bioaccessibilité ne sera intégrée qu'au niveau de l'analyse des incertitudes de l'EQRS. De ce fait, le calcul de risque n'intégrera pas d'emblée le FAR, et l'établissement des mesures de gestion nécessitera alors une discussion avec tous les intervenants du projet (client, administrations,...).

Au vu des incertitudes entourant les notions de bioaccessibilité et biodisponibilité, de nombreuses recherches doivent encore être menées :

- validation plus large des protocoles *in vitro* par des études *in vivo*, notamment la validation des tests simples avec ou sans mise en conditions physiologiques ;
- étude d'autres polluants, notamment les composés organiques. En effet, les recherches ont principalement été conduites pour les composés inorganiques, en particulier le plomb, l'arsenic et le cadmium ;
- approfondissement des recherches sur les modélisations à partir, d'une part, des données physico-chimiques des sols, et, d'autre part, des données sur la spéciation des substances inorganiques ;
- les données sur le comportement des polluants dans l'organisme humain, et notamment sur la métabolisation des substances afin de tenir compte du potentiel toxique des métabolites issus de la molécule mère étudiée.

Enfin, en termes d'axes de développement, les notions de bioaccessibilité et biodisponibilité peuvent être utilisées pour d'autres voies d'exposition (pulmonaire par exemple), d'autres milieux (sous-produits animaux et végétaux), et afin de répondre à d'autres objectifs (évaluation de l'efficacité des techniques de dépollution).

## Context and objectives

To be on the safe side, risk assessments currently consider that the total amount of a substance present in a soil ingested by a person will reach target organs and produce adverse effects. However, *in vivo* studies suggest that only a fraction of the substances present in a soil reaches the bloodstream and then target organs. The ingested matrix that contains the toxic substance is of prime importance in the dose-response effect of the substance under consideration. We must therefore determine the correction factor to be used when calculating the exposure dose in order to take into account the difference between the dose-response effect of the matrix under consideration (soil) and that of the reference matrix used to determine the Toxicity Reference Values (TRV). This correction factor is based on two criteria:

- ✓ Bioaccessibility, defined as the fraction of the administered dose that is dissolved in the gastro-intestinal tract and available for absorption
- ✓ Oral Bioavailability, defined as the fraction of the administered dose that reaches the bloodstream

Including notions of bioaccessibility and/or bioavailability in risk assessments, by means of this exposition-dose correction factor, would enable a better knowledge of the actual danger of substances present in former industrial sites.

The main objective of this study was therefore to carry out a comprehensive study in order to:

- clarify the notions of bioavailability and bioaccessibility in the case of soil ingestion by humans
- determine the international state of knowledge on the present use of these two notions for polluted sites and soils in terms of studies to be carried out, analyses (characteristics and comparison of the various *in vitro* bioaccessibility tests, etc.), bioaccessibility results, bioavailability modeling, and methodology for including these notions in health studies
- propose a method for taking into account these parameters for quantitative health risk assessment (QHRA) in France (in terms of both methodology and analyses)

## Bioavailability and Bioaccessibility: definition and current use

The definition of these concepts depends on the context in which they are used. In this study, only the direct exposure pathway of humans by soil ingestion is taken into account.

The bioaccessible fraction, or *absolute* oral bioaccessibility, of a pollutant in a matrix (e.g. food, soil, water etc.) is the fraction of the pollutant that is extracted from this matrix and dissolved by saliva and digestive fluids in the gastrointestinal tract.

The bioavailable fraction, or *absolute* oral bioavailability, of a pollutant in a matrix (e.g. food, soil, water etc.) is the fraction of the pollutant that reaches the bloodstream (systemic circulation).

There is a correlation between bioavailability and bioaccessibility. Bioavailability is the result of three successive phenomena:

- dissolution of the substance in saliva and stomach and intestinal juices (which corresponds to the bioaccessible fraction)
- absorption through the intestinal epithelium
- hepatic metabolism

*Relative* bioaccessibility and bioavailability are used to compare the extraction of a substance in two forms/different chemical speciation, or of the same substance in the same form in two different matrices. This notion of relativity is important for determining the correction factor (comparison of the soil matrix and the reference matrix of the toxicity study).

The US-EPA is the only government agency that has an officially validated *in vitro* test for an inorganic element – lead – so that the notion of bioaccessibility can be incorporated in health risk assessments. In general, the available data concern mainly the bioaccessibility of trace metals. Research is currently underway at the European level (BARGE<sup>1</sup>), in Canada (BARC<sup>2</sup>) and in the United States (SRBC<sup>3</sup>) to increase knowledge of the bioaccessibility or bioavailability of inorganic pollutants and develop those

---

<sup>1</sup> BARGE : Bioaccessibility Research Groupe of Europe

<sup>2</sup> BARC : Bioaccessibility Research Canada

<sup>3</sup> SBRC : Solubility/Bioavailability Resaerch Consortium

for Persistent Organic Pollutants, including the experimental parameters to be applied and the validation of the representativeness of physiological bioaccessibility tests.

## State of knowledge

### Analysis

Two types of tests are used to measure the bioavailable fraction: *in vivo* tests (that measure the bioavailable fraction) and *in vitro* tests (that measure the bioaccessible fraction). This study focused primarily on *in vitro* bioaccessibility. These tests, which are shorter and less expensive to implement than *in vivo* tests, and entail fewer ethical issues, will surely be developed most in future studies.

The purpose of the *in vitro* tests is to mimic the physiological conditions occurring in the human body during ingestion and digestion. The literature review carried out during this study identified several *in vitro* physiological bioaccessibility tests (carried out at 37 °C) including:

- simple physiological tests that simulate only the gastric phase and use few reagents (HCl, glycine, phosphate)
- physiological tests with gastrointestinal analogues (e.g. enzymes, bile salts) that simulate at least two digestive phases (gastric and intestinal)

These bioaccessibility tests vary depending on:

- the physiological segments studied, pH and the residence times used
- the composition of the digestive solutions used
- the experimental protocol (type and stirring speed, temperature (usually 37 °C), aerobic or anaerobic conditions, the liquid to solid ratio (typically 100:1), the addition or not of food (fed or fasting state), the type of glass used).

The integration of a greater number of physiological compartments and adjustment of residence time have always intended to better represent physiological conditions.

The literature review revealed a large disparity in the results obtained for a given pollutant (even matrix), which is in part due to differences in test protocols:

- For inorganic elements, pH is the main parameter that would explain both the differences in gastric bioaccessibility observed for tests using different gastric pH values, and the difference between gastric and intestinal compartments for a given test.
- For lipophilic organic compounds, the composition of the intestinal solutions probably plays a major role in their solubilization. Indeed, as opposed to inorganic molecules (especially for cationic compounds, such as lead, which appear to undergo complexation and precipitation at intestinal pH values), it seems that the bioaccessibility of organic molecules such as PAHs is greater in the intestinal segment than in the gastric segment.
- The presence of food appears to increase the bioaccessibility of organic molecules (because it enables a better solubilization), while its influence varies for inorganic molecules.

Regardless of which *in vitro* test is used, its physiological representativity, with its own procedure, must be assessed. The results of *in vitro* tests must then be compared to those of *in vivo* bioavailability tests in order to determine whether there is a linear correlation robust enough to estimate the bioavailability of a substance from a measure of its bioaccessibility in solutions simulating biological fluids.

To judge the robustness of the correlation, some authors have identified criteria of validity. These are:

- a statistically significant linear correlation  $r > 0.6$
- a sufficiently wide range of bioavailability values tested (an interval of about 70% between the minimum and maximum values), which should make it possible to validate the correlation for different types of soil, thus theoretically enabling its use regardless of the study site
- a good distribution of values in the range of bioavailability

In addition, the *in vitro* bioaccessibility test must, like any experimental protocol, be repeatable and reproducible. The criteria found in the literature are:

- intra-laboratory repeatability (RSD or CV<sup>4</sup>) <10%
- inter-laboratory reproducibility (RSD or CV) <20%

### **Tests Results**

The test results found in the literature vary widely. In extreme cases, e.g. for lead, all tests and soils combined, bioaccessibility varies from 0.5 to 95 %.

Indeed, as stated above, measured bioaccessibility values vary depending on the test used. They also vary depending on the characteristics of the soil under consideration (pH, organic matter content) and of the tested substance (speciation<sup>5</sup> of inorganic molecules/physical and chemical characteristics of the organic molecules). The interdependence of these three elements makes the interpretation of results and their comparison very difficult and accentuates the need for the bioaccessibility measurement to be specific for the site and the problem studied.

Given the *in vivo* / *in vitro* correlation line established in the literature and the bioaccessibility results obtained in inter-laboratory tests (such as those conducted by the BARC group), it appears that in a significant number of cases (45 %), the results provided by *in vitro* tests (measuring bioaccessibility) are lower than those provided by *in vivo* tests (measuring bioavailability), whereas, theoretically, the opposite was expected.

Using raw results from any *in vitro* bioaccessibility test must be done with care due to a potential underestimation of bioavailability. Nevertheless, if correlations are found, modeling might provide answers in some cases.

### **Modeling**

*In vitro* tests can therefore provide a bioaccessibility value, but the best correction factor to include in the risk calculation is the relative bioavailability value.

There are several ways to determine the relative bioavailability value:

- Directly, by carrying out an *in vivo* test (usually on animals), though for various reasons (ethical, technical, financial, etc.), these tests are difficult to implement
- Indirectly, from other input parameters such as those underlying the environmental availability<sup>6</sup> of the substance. For inorganic compounds, there are two possibilities – modeling bioaccessibility using either the soil's physico-chemical properties or the distribution of the substance in the soil's various solid phases (obtained by sequential extraction). At present, however, there are few available data on these correlation equations. In most cases, the environmental availability of a substance (soil and substance characteristics) do not make it possible to directly estimate its bioavailability (but its bioaccessibility). An additional modeling step is needed if one wishes to estimate the bioavailability of the substance, which thus generates additional uncertainties.
- Indirectly, by measuring bioaccessibility *in vitro*, thus limiting the costs and time needed to carry out *in vivo* tests, while ensuring a good correlation between *in vitro* and *in vivo* measurements (using the correlation criteria listed above). The *in vivo* / *in vitro* correlation equations seem to be the most reliable method for modeling the relative bioavailability of a contaminant. However, given the variability of the equations obtained, it is essential to bear in mind that these estimates are still uncertain. Therefore, to be on the safe side, the equation that gives the highest relative bioavailability value can be preferred. In addition, several correlation lines can be obtained depending on whether one uses data from the gastric phase or the gastrointestinal phase and the phase that has the best correlation with *in vivo* data should be used.

At present, there are relatively few correlation equations in the literature, particularly for the same test and the same substance, which limits any critical analysis of the available equations.

<sup>4</sup> RSD : Relative Standard Deviation ; CV : Coefficient of variation

<sup>5</sup> Speciation is used here as a global definition: distribution of the inorganic compounds in the different solid phases of the soil. It is an operational, rather than a strictly physico-chemical definition of the term. This speciation can be determined by sequential extraction.

<sup>6</sup> According to standard EN ISO 17402 (2011), environmental availability is the fraction of the contaminant that is potentially available to living organisms as a result of physico-chemical desorption processes."

## Study

In health risk assessments involving soil ingestion, *relative* bioavailability (or RAF) makes it possible to appropriately adjust the exposure dose calculation as a function of the "soil" matrix studied. Relative bioavailability must be determined according to the reference matrix, which is the matrix used in the key study used to determine the toxicological reference value (TRV)

Several iterative methods have been suggested in the literature. The methods proposed concern mainly metals and metalloids. There is little information for organic compounds.

In these methods, the relevance of carrying out a bioaccessibility study is always studied beforehand. Once it has been decided that a bioavailability / bioaccessibility study is preferable, determining the RAF is done in different ways by different authors.

Some use bioavailability or bioaccessibility data found in the literature.

Others (RIVM / INERIS) use absolute bioaccessibility data directly from a physiological test carried out in the laboratory, and calculate the RAF theoretically. These theoretical equations are based on simplifications of the correlation between bioavailability and bioaccessibility in terms of absorption and/or metabolism.

Still other authors use bioaccessibility measurements and integrate the results in the *in vivo* / *in vitro* correlation equation associated with the *in vitro* test.

## Review and proposals

### *Analysis of bioaccessibility*

**Based on the pertinence criteria of the protocol (technical feasibility, physiological representativity) and the results (correlation of *in vitro* and *in vivo* results), and repeatability and reproducibility criteria, the European UBM test and the tests that are similar to it (RIVM with or without food and FOREhST) appear to be the most satisfactory.**

However, research and knowledge gathering must continue in order to improve the performance levels of the protocols. The procedures should be consolidated in order to come closer to the results of *in vivo* bioavailability tests, and determine for which pollutants they can be specifically used, possibly even for what soil and in what phase(s) (gastric or gastrointestinal).

The RBALP test (simple physiological test) is still preferred in the United States for estimating the bioaccessibility of lead in soil. It is also being validated for arsenic. Indeed, the authors have validated this test by estimating the error that it gives is 20 %. However, despite its simplicity (gastric phase only), it requires relatively heavy lab equipment (large glassware placed in a thermostatic bath with rotation).

The results obtained for lead and arsenic in the BARC 2011 study seem to indicate that other simple procedures, with or without physiological conditions, might also be developed. Indeed, these procedures have produced values (for a reference soil) closer (or higher, so safer) than the more complex tests. However, these procedures have been much less studied and they have been the object of no *in vitro* / *in vivo* comparison / correlation for several soils, which is a basic step in test validation.

If the tests become more repeatable and reproducible, the correlations observed might also improve and no longer be biased.

Based on this state of the art, general recommendations for the implementation of *in vitro* tests can be made:

- Glassware and sample pre-treatment should be well-suited to the nature of the pollutants studied.
- Several replicate tests should be run in the laboratory.
- Using liquid to solid ratios higher than those used in the basic protocols might be considered.
- The pH at the end of the gastric phase must be monitored and adjusted, if necessary. (These two last points could improve the performance levels of the tests and therefore the results compared to those of *in vivo* tests.)
- It might be of interest to run the tests under both fed and fasting conditions in order to study the bioaccessibility of inorganic elements. For organic molecules, the addition of food seems to be imperative.

- The systematic use of reference soil(s) is advised in order to validate the analytical runs.
- Total contents must be measured on the same fraction as that used for testing bioaccessibility (usually the <250  $\mu\text{m}$  fraction).

### **Methodology for the integration in quantitative health risk assessment**

The best estimation of the RAF is obtained from the results of *in vitro* bioaccessibility tests, preferably with the UBM test and tests that are similar to it (RIVM fed or fasting and FOREhST). These tests give values that are very specific to the study site, and relatively robust models make it possible to estimate the bioavailability of the pollutant(s) studied.

A logic diagram was drawn to summarize and structure the various methods that can be used to include RAF in health risk assessments. Some steps still entail some uncertainty as this logic diagram is based on the current state of knowledge and must be modified to measure the progress of new research.

Studying the logic diagram is itself a prerequisite for the procedure in order to give the researcher an overall view of the approach and to aid in his or her thought process, especially while investigations are being carried out.

The first step (in the diagram and also in most of the publications studied) is to determine whether or not a study of site-specific bioaccessibility is appropriate. It makes it possible to rapidly identify situations for which the use of bioaccessibility to assess risk will not bring any major advantage (e.g. cases where inhalation is the principal exposure pathway or risk is dispersed).

The notions of bioaccessibility and bioavailability do not fundamentally alter the normal site diagnosis steps (initial and detailed). However, it is recommended that 1) composite samples not be used, and 2) information be gathered concerning element speciation and forms in the soil by sequential extraction, for example.

Two questions must then be asked:

- Are the time and costs associated with the inclusion of bioaccessibility justified compared to the estimated costs of site remediation?
- Is there an *in vitro* bioaccessibility test that has been validated *in vivo* for the risk agent being studied?

If the answers to these questions are positive, the RAF can be included in the main study of QHRA in three situations:

- If the experimental models and reference matrices are identical or similar in both the study and the *in vivo* toxicological study, the robust correlation equations can be used directly,  $\rightarrow \text{BA}_{\text{rel}} \approx \text{RAF}$ .
- If the models / matrices are different but the bioavailability in the matrix of the toxicological study is found in the literature, the RAF can be estimated from the latter and the raw bioaccessibility result (if it can be proved that it is not underestimated). Thus, assuming a conservative absorption of 100% and no metabolism,  $\rightarrow \text{RAF} = \text{BAC}_{\text{soil}} / \text{BA}_{\text{VTR}}$ .
- If the models / matrices are different and the bioavailability in the matrix of the toxicological study is not found in the literature, bioaccessibility tests on both the soil in the study and the matrix of the toxicology study can be carried out. Thus, assuming that absorption and metabolism are phenomena independent of the matrix,  $\rightarrow \text{RAF} = \text{BAC}_{\text{soil}} / \text{BAC}_{\text{VTR}}$ . This enables us to overcome any experimental bias.

In all three cases, risk management measures will depend directly on the results of the risk calculation that includes the RAF. In other cases, i.e. when the RAF might be underestimated, it can be included in the QHRA uncertainty analysis. The risk calculation will not therefore integrate the RAF immediately and determining management measures will require a discussion with all project stakeholders (client, administrations, etc.).

### **Using this approach led to the following results:**

- For arsenic and cadmium, bioaccessibility can be included directly in the main QHRA study ( $\text{BA}_{\text{rel}} = \text{RAF}$ );
- For lead, it is advisable to study the inclusion of the RAF in the QHRA uncertainty analysis.

- For antimony, and PAH (or other substances), since there is insufficient data, no method appears to be quite safe at this stage.

## Conclusion

In order to adjust the risk calculations and take into account the fact that only a fraction of an ingested dose of a contaminant, variable depending on the compound, actually reaches the bloodstream (and target organs), the concepts of bioavailability and/or bioaccessibility can be included in QHRA.

For health risk assessments involving the ingestion of soil, *relative* bioavailability (or RAF) is the factor that appropriately adjusts the calculations of a study's target exposure dose.

At present, the best estimate of the RAF is obtained from the results of *in vitro* bioaccessibility tests.

This study shows that the UBM *in vitro* test and tests that are similar to it (RIVM and FOREhST) stand out from others owing to their physiological representation (in terms of protocol and results) and the relative ease of their implementation (time, materials, etc.). However, some simple tests, such as the SBRC / RBALP, also showed significant results and have, therefore, been approved by some agencies (United States, Australia).

A logic diagram for including RAF in QHRA is proposed. Two situations are possible:

- If the matrix and the experimental model of the *in vivo* / *in vitro* correlation study are identical or similar to those of the toxicological study (used to determine the VTR), the correlation equation (derived from the *in vivo* validation / *in vitro* test) can be used directly to calculate the RAF.
- Otherwise, the RAF must be estimated using the raw bioaccessibility results (from the *in vitro* test), as long as they are on the safe side (evaluation of any possible underestimation of the RAF).

There are two ways to include the notions of bioavailability and bioaccessibility in QHRA:

- Bioaccessibility can be used in the main QHRA study if the RAF is considered to be representative and/or safe. In this case, risk management measures will depend directly on the result of the risk calculation including the RAF.
- If there is some uncertainty (especially a possible underestimation of the RAF), bioaccessibility will be integrated at the level of uncertainty analysis of QHRA. The risk calculation does not incorporate the RAF at the beginning and developing risk management measures will require discussions with all project stakeholders (client, administrations, etc.).

Given the uncertainties surrounding the concepts of bioavailability and bioaccessibility, much research must still be carried out. This includes:

- More validation of *in vitro* protocols by *in vivo* studies, including the validation of simple tests with or without physiological conditions
- Studies of other pollutants, including organic compounds. Indeed, research has been carried out mainly for inorganic compounds, especially lead, arsenic and cadmium.
- More modeling (correlation equations) both of physico-chemical data and of speciation data for inorganic elements
- Gathering data on the behavior of pollutants in the human body, including the metabolism of substances, in order to take into account potential toxic metabolites of the parent compound studied.

Finally, in terms of areas of development, the concepts of bioavailability and bioaccessibility can be used for other exposure pathways (e.g. lung), other media (animal by-products and plant), and to respond to other objectives (assessment of the efficiency of decontamination techniques).