



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Institut National Polytechnique de Toulouse
Discipline ou spécialité : *Biogéochimie de l'environnement*

Présentée et soutenue par *Gaëlle UZU*
Le *30 Octobre 2009*

Titre : *Spéciation, transfert vers les végétaux et approche toxicologique des émissions atmosphériques d'une usine de recyclage de plomb.*

JURY

Mme Camille DUMAT, Maître de Conférence Institut National Polytechnique de Toulouse (INPT-ENSAT), EcoLab, directrice de thèse

Mme Catherine KELLER, Professeur Université Paul Cézanne Aix-Marseille, CEREGE, rapporteur

M. Franck MAROT, ADEME, membre

M. Bernd NOWACK, Directeur de Recherche, EMPA, Zurich, rapporteur

M. Philippe PRADERE, directeur STCM, membre

Mme Anne PROBST, Directeur de Recherche CNRS, EcoLab, examinateur

M. Jérôme ROSE, Directeur de recherche CNRS, CEREGE, examinateur

Mme Sophie SOBANSKA, Chargé de recherche CNRS, Université de Lille, LASIR, Membre

Ecole doctorale : *Sciences de l'Univers, de l'Environnement et de l'Espace (Sdu2e)*

Unité de recherche : *Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle (EcoLab)*

Directeur(s) de Thèse : *Camille DUMAT*

Rapporteurs : *Bernd NOWACK, Catherine KELLER*



Résumé : Depuis la révolution industrielle en Europe (XIX^e siècle), les nombreuses activités anthropiques ont provoqué des changements environnementaux globaux considérables. La composition de l'atmosphère terrestre en particulier, a été fortement modifiée par l'émission de polluants gazeux et particulaires. Actuellement, l'industrie métallurgique de seconde fusion contribue de façon significative aux émissions atmosphériques de métaux. C'est pourquoi ce travail de thèse s'est focalisé sur l'étude des transferts et impacts sur les sols, les végétaux et l'homme, des particules émises par le procédé de recyclage du plomb en relation avec leurs propriétés physico-chimiques. Trois sources principales d'émissions de particules ont été identifiées dans le procédé du recyclage du plomb et caractérisées en vue d'étudier les impacts potentiels sur les cibles végétales et humaines. Les particules échantillonnées (postes de travail et émissions canalisées) et ségréguées en fonction de leur taille (PM_{tot} , PM_{10} et $PM_{2,5}$) sont principalement composées de métaux (jusqu'à 50% en masse de la composition totale en métaux de transition, alcalins et alcalino-terreux), avec une majeure partie de plomb (25-45 %). Les spéciations majoritaires du plomb sont la galène (PbS), le sulfate de plomb ($PbSO_4$) ou dérivés ($xPbO.PbSO_4$ $x=1,2$ ou 3). L'étude du transfert des particules dans le système sol-plante a montré que, lorsque la taille des particules de process présentes dans le sol diminue (de $10\mu m$ à $2.5\mu m$), le transfert du plomb vers les parties aériennes des salades augmente de 20%. Le transfert foliaire de plomb issu des particules de process a été mis en évidence et des mécanismes d'absorption ont été proposés. Enfin, l'étude exploratoire des particules riches en plomb sur la santé humaine a permis de montrer que la diminution de la taille des particules ingérées augmentait la bioaccessibilité gastrique du plomb. Dans le cas de l'inhalation, il a été démontré que les particules n'induisaient pas de cytotoxicité jusqu'à $50\mu g/cm^2$, mais provoquaient une réponse inflammatoire dose-dépendante des cellules épithéliales pulmonaires.

Mots clés : Plomb, métaux, PM_{10} , $PM_{2,5}$, émissions atmosphériques, spéciation, *Lactuca Sativa*, transfert sol-plante, transfert foliaire, cytotoxicité, inflammation, bioaccessibilité.

Remerciements

Avis au lecteur : je tiens à préciser qu'au moins 400 Batavias (*Lactuca sativa*) ont été malmenées, maltraitées, broyées, digérées dans cette thèse. Ames sensibles s'abstenir. Et maintenant une longue liste de mercis relatifs à cette entreprise !

Ces travaux ont été effectués au laboratoire d'écologie fonctionnelle EcoLab au sein de l'école nationale supérieure d'agronomie de Toulouse (ENSAT). Tout d'abord je tiens à remercier le directeur du laboratoire Eric Chauvet pour m'avoir accueilli durant ces trois ans et l'ensemble des chercheurs pour toutes ces discussions stimulantes. Ensuite un grand merci à ceux qui ont financé et suivi d'un œil attentif ces trois ans : l'ADEME et la Société de Traitements Chimiques de Métaux (STCM). Je pense en particulier à Philippe Pradère et Michel Milhes de la STCM qui m'ont ouvert les portes de l'entreprise, m'ont apporté leur expérience du terrain et ont mis la main à la patte pour l'échantillonnage des particules ou encore pour arroser les salades ! Et puis Franck Marot, de l'ADEME pour toutes les améliorations et discussions post-rapports d'avancement !

Merci, aux rapporteurs Catherine Keller et Bernd Nowack et tous les membres du jury Anne Probst, Sophie Sobanska, Philippe Pradère, Franck Marot et Jérôme Rose d'avoir accepté d'évaluer mes travaux.

Maintenant, les mercis pour les scientifiques qui ont contribué de très près :

Camille, directrice de choc, merci de m'avoir fait jardiner pendant trois ans. Je n'envisage pas ma reconversion en maraîchage mais si cette idée me revient, je serais prête ! Ces trois années ont été uniques, scientifiques, drôles et très réjouissantes (qui a dit que la science devait être austère ?) et je te remercie vraiment pour ta confiance et la liberté que tu m'as accordée dans l'orientation des travaux.

Viennent ensuite, Géraldine Sarret (LGIT, Grenoble) et Sophie Sobanska (LASIR, Lille), pour votre disponibilité et nombreux conseils scientifiques : les « spectro-girls », un énorme merci d'avoir été à mes côtés. Je n'oublierais pas de sitôt l'incroyable séjour au synchrotron SOLEIL, la salle des machines, « ici Houston », à vous les commandes 3..2..1..0, recharge d'électrons!!! et puis Géraldine, la soirée ski de fond après les dépouillements de spectres EXAFS...

Merci à mon « outstanding » comité de pilotage de m'avoir accompagné pendant ces trois ans! En particulier : à Franck Marot de m'avoir promis ses pincettes à vélo ADEME...à Sébastien Denys pour ses mails « à propos » sur les deadlines entre-autres, à Karine Tack pour ses conseils pour

m'éviter des manip, à Sophie Sobanska pour m'avoir fait découvrir « le monde merveilleux du Raman ». A Francis Douay pour ses investigations dans les jardins lillois, à Anne Probst pour ses propositions de laitues en plastiques, à Jérôme Silvestre pour les « clip your feuilles de laitue » et à Mr Pradère pour nos discussions de terrain.

Un merci tout spécial à l'équipe de réactivité des particules de l'IST à Lausanne et l'équipe de biologie fonctionnelle adaptative du LRM CX (Paris VII) de m'avoir accueillie pour la partie toxicologique de l'étude ainsi que l'INERIS pour la bioaccessibilité gastrique. Et plus particulièrement à Magdalena Sanchez, Jean-Jacques Sauvain, Mickael Ridieker, Stéphanie Val, Armelle Baeza, Karine Tack, Sébastien Denys et Julien Caboche !

Venons en maintenant à tous les personnels du laboratoire qui ont contribué à la bonne ambiance de la réalisation de cette étude :

Merci à Je-Annick, secrétaire multi-casquettes pour TOUT. Sauf que j'attends toujours ma palette de Nounours à la guimauve au chocolat...A José, notre chef d'équipe, que la force basque soit avec toi (et avec una tequila cabrita !!), à Maritxu, pour le yoga et les discussions confitures, à Georges pour tes investigations sur mes données C,H,O: je me sentais moins seule comme chimiste en terre agro ! A Eric, Jean-Luc, Anne et Laury pour nos grandes discussions sur la recherche et plus personnelles, à David pour tes questions métaphysiques lors de nos repas à l'INRA et Sabine pour tes conseils pour toujours tout optimiser !

Les copinous thésards ou contractuels qui avaient les mains dans le cambouis : Merci à Laure, tes missions mousse et épines de sapins m'ont fait rêver et puis nos trois ans de partage de bureau se passent de commentaires, bon vent mademoiselle ! A SoL, pour les soirées tritons, les randos et bien plus encore...et ce n'est pas fini ! Merci aux zèbres africains Mahamadou et Mathieu pour vos paroles de sages et Lobat, notre soleil d'Iran. Merci à Sylvain, l'autre auvergnat pour avoir comblé mes manques de Saint-Nectaire et de Gaperon. Merci à Marie, passeuse de relais plombé, à Geoffrey, parce que les explosifs, j'adore ! Ensuite, Bouz pour avoir offert un 4 juillet 2008 mémorable à ma cheville, au petit Tom pour tes conseils R et Aurore parce que ça faisait plaisir de voir quelqu'un qui pulse ! Thierry arrête de maltraiter Barbus Barbus, toi les poissons, moi les salades, on va se mettre la SPA et Brigitte Bardot sur le dos. Laurie pour tes petits yeux de poissons rouges nos lendemains de soirée. Et puis merci à Anaïs et Marion les Sigistes d'à côté d'avoir ensoleillé la dernière année de thèse !

Merci à la salle café rebaptisée « la conviviale » de nous avoir délivré un si merveilleux café coupé aux haricots rouges pendant 3ans. Merci aux carottes à l'eau et l'huile aux pâtes, oups non pâtes à l'huile du RestoU de l'ENSAT ...

Enfin, merci à l'Axe Sauvage, aux réseaux de neurones Oehleristiques, à l'ICP-OES de nous avoir lâché au bon moment, et aux diatomées qui ne sont pour rien dans cette histoire.

Viennent enfin mes proches qui me supportent depuis 27 ans, qui ont subis les années salade, que dis-je les années thèse !

Papi et Mamie, vous voyez je suis docteure et je ne peux même pas vous faire d'ordonnance...Merci Papa et Maman de m'accompagner dans toutes mes illuminations et lubies, je pense qu'avec la thèse on est à l'apothéose, ça devrait se calmer maintenant ! Enfin bon « fallait pas me faire » si vous ne vouliez pas en prendre pour autant de temps avec moi ! Mais j'avoue vous êtes un service après-vente qui assure...

Et puis les Very Special Copines : Merci Fofie d'accepter mes grains de folie depuis la seconde, pour toutes ces choses vécues à tes côtés, et ta compréhension Gaellistique intrinsèque...Merci M'Emma Mongole ma muse, pour ta subtilité, tes façons de voir les choses hors du cadre...et puis toutes nos escapades...c'est tellement bon que ça se passe de commentaires ! Merci Camille pour tes yeux vert-cassis enfin tu sais...Merci Vanessa de t'être réveillée.

Merci à la tribu de Cpbien d'être toujours là : Deuf, Nolwenn, Lolo, Marcel, BG, Podo, Manu, Natacha, Tomtom, Julie, Luquette, Lagus, Agnus, Axel, Manu Confiant, Faguish, Coralie, Clémence, Margaux, Marine, Sandra, Vaness, Coach, la team Fish et tous ceux que j'oublie !

Aux vieux de la vieille de la prépa : Nono, Jojo, JFK, Raf, Lise, Anaïs, Apo et toutes les nouvelles pièces rapportées !

Aux personnes qui m'entourent et qui font que j'en suis là aujourd'hui. Je pense à Françoise Naël pour m'avoir donné le virus de la chimie, Patrice Collier pour la philo-piano, Mr Rayez pour la chimie quantique comme vous ne l'avez jamais vue et Valérie Vignéras pour la cuisson sous tous les angles ! Mamie Sureau et Nounou pour m'avoir élevée avec de bons petits gâteaux au chocolat, et Bouat à moustaches où la mémoire de Pierre reste indélébile et où une autre histoire commence.

Et puis un merci spécial au canal du midi, cette merveilleuse échappatoire quand rien ne corrèle...les Pyrénées, défouloir du week-end où j'ai trouvé bon nombre de réponses de ces travaux.

Et enfin merci à toi, mon Mathieu de sourire comme aux premiers jours à mes bêtises, mes idées folles, et surtout, à toi le tour maintenant !

Quelques citations « plombées »

L'Albertine d'autrefois, invisible à moi-même, était pourtant enfermée au fond de moi comme aux «plombs» d'une Venise intérieure (Proust, La Fugitive., 1922, p.639).

Si j'ai un jour du plomb dans la tête, ce sera du 7,65 (Allais).

Elle ne sentait plus sa faim ; seulement, elle avait un plomb dans l'estomac, tandis que son crâne lui semblait vide (Zola, Assommoir, 1877, p.750).

Pendant que le soleil darde à plomb ses rayons sur la plaine, hommes et animaux suspendent leur labeur (Toepffer, Nouvelles genèvoises, 1839, p.10).

On peut (...) à l'aide d'un agent (...) transmuier (...) le mercure en argent et le plomb en or. Et cet agent c'est la pierre philosophale (Huysmans, Là-bas, t.1, 1891, p.126)

Il portait à ses cadenettes des brimborions de plomb à la mode des anciens (Erckmann-Chatrion, Histoire d'un paysan t.2, 1870, p.210).

Plomb et puys sont nés au milieu de la nuit dans les forges de Vulcain. Autant de visages pour une unique et si petite montagne, cela relève de la sorcellerie (Cantal, textes : Fabienne Faurie, Marie-Hélène Lafon, Benoît Parret, Photos Pierre Soissons, 2005)

	6
1 Introduction générale et Objectifs du travail expérimental	9
.1. Contexte	11
.2. Eléments bibliographiques, questions scientifiques et objectifs visés.	16
.2.1 Objectif n°1.	16
- des particules de process de l'usine STCM et plus particulièrement des $PM_{10/2.5}$.	16
.2.2 Objectif n°2.	17
de la taille des particules et de la spéciation du plomb sur la phytodisponibilité par voie atmosphérique et sur le transfert sol-plante.	17
.2.3 Objectif n°3.	20
de l'impact toxicologique des émissions particulaires riches en plomb après inhalation ou ingestion.	20
.2.4 Originalité de l'approche	28
.2.5 Références bibliographiques	29
2 Matériels et Méthodes	33
.1. Site d'étude et échantillonnage	35
.1.1 Présentation de l'entreprise	35
.1.2 L'usine STCM de Toulouse : situation	36
.1.3 Les différents processus réalisés en ateliers de production :	37
.1.3.1 Le site de broyage	38
.1.3.2 L'atelier des fours : fusion-réduction des batteries	38
.1.3.3 L'atelier d'affinage	40
.1.4 Météorologie de la zone	40
.1.5 Emissions de l'usine.	43
.1.6 Collecte des particules dans l'usine	44
.1.6.1 Localisation des sources :	44
.1.6.2 Mise en œuvre :	46
.1.7 Remise en suspension des particules collectées	48

.1.7.1 Principe	48
.1.7.2 Mise en œuvre :	50
.2. Caractérisation des particules	51
.2.1 Démarche expérimentale	51
.2.2 Techniques chimiques	53
.2.2.1 Mesures des concentrations élémentaires	53
.2.2.2 Estimation de la fraction potentiellement biodisponible des particules.	54
.2.3 Techniques physiques	56
.2.3.1 La granulométrie laser	56
.2.3.2 La diffraction des rayons X	58
.2.3.3 La microscopie électronique à balayage analytique	59
.2.3.4 La microspectrométrie Raman	59
.2.3.5 EXAFS	63
.3. Transfert du plomb des particules vers les végétaux	66
.3.1 Généralités	66
.3.1.1 La laitue : <i>Lactuca sativa</i>	66
.3.1.2 Conditions de culture	66
.3.2 Transfert sol-plante	67
.3.2.1 Principe des micro-cultures	67
.3.3 Transfert atmosphère-plante	71
.3.3.1 Conditions d'exposition	71
.3.3.2 Analyses.	72
.4. Transfert du plomb des particules vers l'Homme	73
.4.1 Inhalation	73
.4.1.1 Essais in-vitro : cytotoxicité et réponse inflammatoire	73
.4.1.2 Test chimique acellulaire : l'essai DTT	76
.4.2 Ingestion	81
.4.2.1 Protocole d'estimation de la bioaccessibilité	82
.5. Références bibliographiques	86
3 Caractérisation des particules	87
.1. Avant propos	89

.2. Characterization of lead-recycling facility emissions at various workplaces using a complementary approach. _____ 90

.2.1 Introduction _____	91
.2.2 Experimental Section _____	92
.2.2.1 Particle sampling and size separation. _____	92
.2.2.2 Characterization of particles _____	93
.2.2.3 Extraction of bioavailable fraction _____	94
.2.3 Results and discussion. _____	95
.2.3.1 Granulometric distribution _____	95
.2.3.2 Elemental total contents _____	96
.2.3.3 Speciation results _____	99
.2.3.4 Individual particle analysis: _____	100
.2.3.5 Potential availability of particles: _____	102
.2.4 Conclusions and prospects. _____	104
.2.5 Acknowledgements _____	105
.2.6 Bibliography _____	106

4 Transfert du plomb issu des particules vers les végétaux ____ 109

.1. Transfert sol-plante _____ 111

.1.1 Avant propos _____	111
.1.2 Study of lead phytoavailability for atmospheric industrial micronic and submicronic particles in relation with lead speciation. _____	113
.1.2.1 Capsule _____	113
.1.2.2 Abstract _____	113
.1.2.3 Introduction _____	114
.1.2.4 Materials and methods _____	116
.1.2.5 3. Results _____	121
.1.2.6 Discussion _____	128
.1.2.7 Conclusions and perspectives _____	131
.1.2.8 Acknowledgements. _____	132
.1.2.9 References. _____	133

.2. Transfert atmosphère-plante _____ 137

.2.1 Avant-propos _____	137
-------------------------	-----

.2.2 Foliar lead uptake by lettuce exposed to atmospheric fallouts.	139
.2.2.1 Abstract	139
.2.2.2 Briefs	140
.2.2.3 Introduction	140
.2.2.4 Experimental section	142
.2.2.5 Results and discussion	145
.2.2.6 Acknowledgment	154
.2.2.7 References	155
.2.3 Supporting information	158
5 Transfert du plomb issu des particules vers l'homme	167
.1. Transfert du plomb issu des particules vers l'homme	169
.1.1 Avant-propos	169
.1.2 Bioavailable inhaled lead and bioaccessible gastric lead : case of workplaces in a lead-recycling plant.	172
.1.2.1 Context:	173
.1.2.2 Material and Methods:	175
.1.2.3 Results and discussion.	179
.1.2.4 Discussion	187
.1.2.5 Conclusion:	189
.1.2.6 Bibliography	189
6 Discussion et conclusions	193
_ bibliographiques	203
des illustrations	204
des tableaux	207

Glossaire

Apoplasme: Continuum extracellulaire interne à la feuille, dans lequel l'eau et les solutés peuvent naviguer par diffusion passive non sélective.

BARGE: BioAccessibility Research Group of Europe.

Cellules de garde: Composantes du stomate, cellules réniformes qui délimitent l'ostiole et sont sensibles aux changements de pression osmotique.

DRIRE : Direction Régionale de l'Industrie de la Recherche et de l'Environnement.

DRX : Diffraction des rayons X.

Escalator muco-ciliaire : Tapis organique recouvert de cils en mouvement qui assure le nettoyage des bronches en remontant les impuretés vers l'extérieur.

ESEM-EDX : Microscope environnemental à balayage électronique couplé de l'analyse chimique par spectrométrie d'émission de rayons X à dispersion d'énergie.

EXAFS : Spectroscopie d'absorption des rayons X, Extended X-ray Absorption Fine Structure.

ICP-MS : Analyse par spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif.

NFκB : Nuclear factor-kappa B, protéine de la famille des facteurs de transcription impliquée dans la réponse immunitaire et la réponse au stress cellulaire.

Nocif : Produit qui par inhalation, ingestion ou pénétration cutanée peut entraîner des risques de gravité limitée.

ORAMIP : Observatoire Régional de l'Air en Midi-Pyrénées.

Ostiole : Orifice placé au centre du stomate qui s'ouvre et se ferme en fonction de la turgescence des cellules stomatiques.

Phonon : Vibration collective d'un ensemble d'atomes en interactions. Si on impose localement, un mouvement perturbateur sur un solide qui déplace un certain nombre

d'atomes de leur position d'équilibre, ceux-ci agissent sur leurs voisins, et la perturbation locale de départ s'étend de proche en proche au solide tout entier sous forme d'un mouvement collectif.(source, Encyclopédie Universalis).

Phytotron : Pièce de culture dont on peut contrôler les paramètres environnementaux (humidité, température, éclairage).

RMS : Microspectrométrie Raman.

μ XRF : MicrofluorescenceX.

REACH : Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals.

Spéciation : Ensemble des espèces chimiques sous lesquelles un élément se présente dans un environnement donné : ses différents états d'oxydation, ses conformations, ses complexes ou ses formes transitoires.

STCM : Société de Traitements Chimiques des Métaux.

Stomate : Orifice de petite taille présent dans l'épiderme des organes aériens des végétaux, permettant les échanges avec l'atmosphère et la régulation de la pression osmotique de la plante.

Toxique : Produit qui par inhalation, ingestion ou pénétration cutanée peut entraîner des risques graves, aigus ou chroniques et même la mort.

Trachéo-bronchique : Qui concerne la trachée et les bronches.

Chapitre 1

Introduction générale et Objectifs

du travail expérimental

1.1. Contexte

Le plomb est l'un des contaminants les plus répandus dans l'environnement (Hernández-Ochoa et al., 2005; Jarup, 2003). Toxique ou nocif, même à faible concentration pour de nombreux organismes vivants, ses rejets dans l'environnement, sont désormais strictement contrôlés en Europe. La concentration en plomb atmosphérique a nettement diminué en France depuis l'interdiction de son utilisation comme antidétonant dans les essences en Janvier 2000 (CITEPA, 2009). Cependant, des particules plombées sont toujours générées dans l'atmosphère sous forme d'effluents gazeux ou particulaires, par des activités industrielles, ou par re-suspension à partir de sols contaminés (Batonneau et al., 2004; Ohmsen, 2001).

Aujourd'hui, les seuils de coupures des filtres industriels sont de plus en plus faibles, et les émissions générées sont donc **majoritairement submicroniques**. Or, **la taille des particules** influence fortement leur devenir. En effet, les particules les plus grosses retombent rapidement sur les sols ou les eaux superficielles. Les plus fines ($<0.1\mu\text{m}$) restent en suspension dans l'air: elles peuvent être véhiculées sur de très longues distances en l'absence de précipitations (Prospero, 1999; Kallos et al., 2007), tant qu'elles ne sont pas interceptées par les surfaces des bâtiments, ou les surfaces foliaires. Ce phénomène est à l'origine des traces de la métallurgie romaine retrouvées dans les glaces polaires (Hong et al., 1996). La toxicité potentielle des particules est également accrue lorsque leur taille diminue (Fernandez Espinosa et Oliva, 2006; Ruby et al., 1992).

C'est pourquoi des directives européennes imposent des mesures des concentrations élémentaires des polluants, selon le diamètre aérodynamique des aérosols (Directives 2004/107/CE et 1999/30/CE). Les particules de diamètre aérodynamique moyen inférieur à $10\mu\text{m}$ et à $2.5\mu\text{m}$ sont notées respectivement **PM₁₀ et PM_{2.5}** (PM: Particulate Matter en anglais). Ces aérosols transportent des métaux toxiques pour la santé humaine et l'environnement (Pb, Hg, Cd en particulier). Cependant, ces textes ne suggèrent que rarement d'établir la **spéciation des éléments**, définie comme étant la distinction entre les différentes formes de liaisons possibles de l'atome étudié dans un environnement donné. Pourtant, cette information est essentielle pour déterminer la biodisponibilité de l'élément (Ruby et al., 1996; Dahmani-Muller et al., 2001; Denys et al., 2009).

Les particules fines sont très réactives, en raison de leurs surfaces spécifiques très élevées, de leur hygroscopicité et de leurs propriétés optiques (Fedlheim et Foss, 2001). Pourtant, la phyto-disponibilité et la phyto-toxicité des particules plombées en relation d'une part avec leur taille, et d'autre part avec la spéciation chimique du plomb ont été peu étudiées. Plus particulièrement, le transfert atmosphérique du plomb vers la plante, par absorption directe de particules au niveau foliaire, n'a pas été étudié. Or, la majeure partie des émissions est de l'ordre du micromètre, alors qu'un stomate de laitue mesure 10 micromètres de large en période d'ouverture (Hassan & Frank, 2003). Ceci signifie donc, que la majeure partie des émissions industrielles peuvent interférer (obstruer ou franchir) cette barrière physique, et qu'il est pertinent de s'intéresser à cette voie de transfert.

D'un point de vue toxicologique, la spéciation des particules est aussi de première importance, car elle conditionne en partie la fraction biologiquement biodisponible régissant la toxico-cinétique de l'élément (Yokel et al., 2006). L'ingestion et l'inhalation sont aussi dépendantes d'une part du facteur humain, c'est-à-dire la variabilité interindividuelle d'une part (sexe, âge et état général) (Hopper & Mathews, 1983) et, des interactions intrinsèques des constituants des particules, d'autre part. Ceci explique les difficultés à mettre en œuvre les évaluations des risques sanitaires.

Aujourd'hui, les sources d'émission de plomb dans l'environnement **sont liées à la métallurgie, les verreries et le recyclage des batteries** (Donisa et al., 2000; Miquel, 2001). Les entreprises qui pratiquent cette dernière activité en France sont des installations classées pour la protection de l'environnement (ICPE). Cette réglementation concerne toutes les exploitations industrielles ou agricoles, susceptibles de créer des risques, ou de provoquer des pollutions ou nuisances, notamment pour la sécurité et la santé des riverains (Code de l'environnement, Livre V, Titre I, Art. L 511-1). Les usines de recyclage de métaux sont soumises à autorisation préfectorale, et à ce titre, doivent respecter plusieurs obligations liées à la protection de la santé et de l'environnement. Les enjeux rencontrés dans le contexte général des installations émettrices de plomb concernent la contamination des animaux et de la chaîne alimentaire, des eaux, des écosystèmes et la santé humaine.

Par ailleurs, le plomb est considéré comme une substance chimique très préoccupante (SVHC : substance of very high concern) dans le nouveau règlement européen REACH, (EC 1907/ 2006, Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) qui préconise de définir les **scénarios d'exposition** sur tout le cycle de vie de la substance chimique. Cette notion de scénario d'exposition,

est également au cœur des nouveaux outils développés, pour les évaluations des risques sanitaires, liés aux sites et sols pollués, avec la réalisation des **schémas conceptuels**. Le règlement européen REACH conseille également, lorsqu'il est possible, le remplacement progressif des SVHC par des produits avec un impact environnemental et toxicologique moindre. Actuellement, des substituts du plomb ont seulement été trouvés pour certaines de ses utilisations. Par exemple, le plomb tétraéthyle, antidétonant additionné à l'essence a été remplacé par des alcools, éthers ou aromatiques. Cependant, pour la fabrication de batteries, utilisation principale de ce métal, il n'existe actuellement aucun substitut.

Dans ce contexte général, les enjeux scientifiques de cette thèse consistaient à comprendre le transfert du plomb vers les végétaux et l'homme induit par les émissions d'une usine de recyclage de batteries, ceci en fonction de la taille des particules et de la spéciation chimique du plomb. Dans ce contexte scientifique, réglementaire et industriel, il est apparu essentiel de réaliser ces travaux de recherche transversaux « *Spéciation, transfert vers les végétaux et approche toxicologique des émissions atmosphériques PM_{10} et $PM_{2.5}$ d'une usine de recyclage de plomb* » au sein du laboratoire ECOLAB, en collaboration étroite avec la Société de Traitements Chimiques des Métaux (STCM, usine de recyclage de batteries au plomb, ICPE classée SEVESO II) et l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME)¹.

Dans le présent manuscrit, la démarche scientifique est décrite en fonction des trois objectifs suivants (voir *Figure 1*) :

¹ Thématique qui intéresse les directions en charge des sites et sols pollués et de la qualité de l'air.

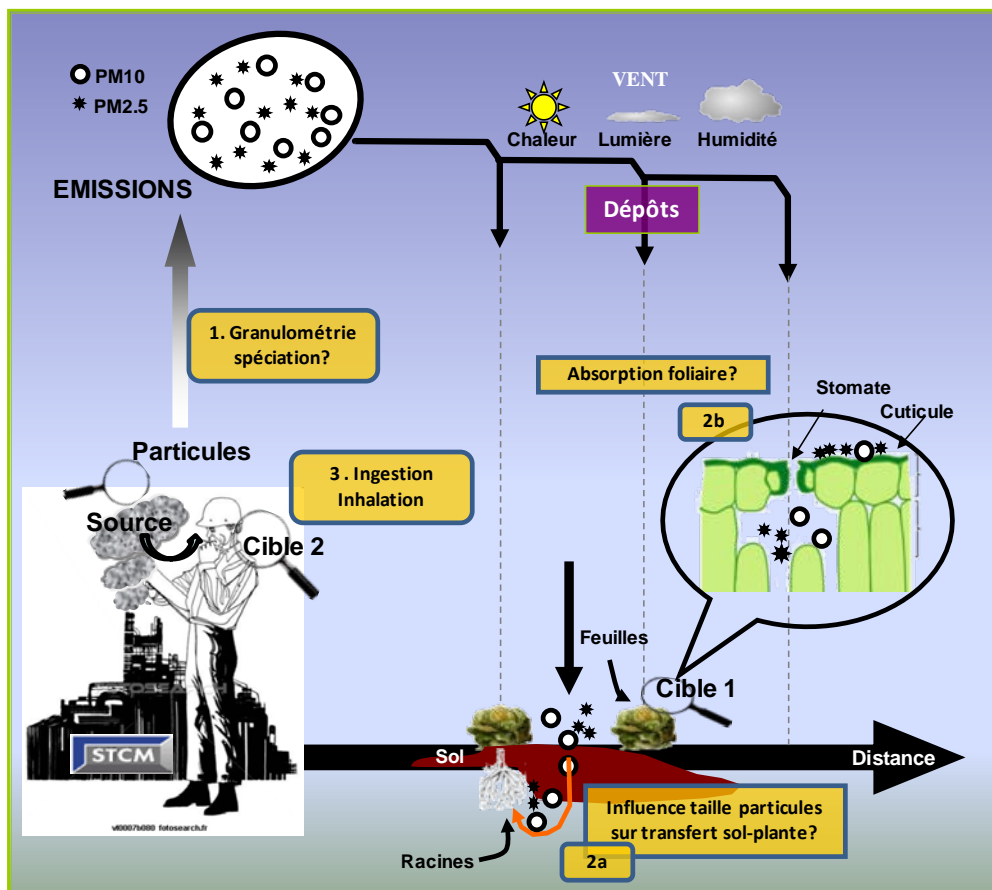


Figure 1 : (1), (2a), (2b) et (3) : questions scientifiques abordées par cette thèse. La cible 1 correspond aux végétaux et la cible 2 aux salariés de l'entreprise.

1. Caractériser les particules plombées émises au niveau des différents postes de travail, cheminées et environs de la Société de Traitement Chimiques des Métaux (STCM). Ces éléments de connaissance viennent en complément des démarches engagées par la société, qui a mis en place depuis plusieurs années une démarche hygiène-sécurité-environnement (HSE), afin de réduire le risque potentiel lié à ses activités.
2. Etudier le transfert de ces particules vers les végétaux :
 - Déterminer l'influence de la taille des particules plombées, et de la spéciation du plomb sur le transfert sol-plante par la réalisation de micro-cultures en conditions contrôlées.
 - Etudier sur le terrain l'absorption du plomb d'origine atmosphérique par les parties aériennes des plantes.

3. Etudier l'impact du transfert potentiel des particules vers l'homme, via les deux voies principales d'exposition : l'inhalation et l'ingestion.

Ces trois objectifs recouvrent des champs scientifiques complémentaires et distincts. Ainsi, une courte analyse bibliographique est présentée ci-après pour chacun d'eux.

1.2. Eléments bibliographiques, questions scientifiques et objectifs visés.

1.2.1 Objectif n° 1.

Caractérisation des particules de process de l'usine STCM et plus particulièrement des PM_{10/2.5}.

Pour déterminer l'impact des émissions de plomb de l'usine STCM au niveau environnemental et sanitaire, la première étape consistait à caractériser la physico-chimie des particules émises par le process.

Depuis plusieurs années, d'importants efforts ont été entrepris par les pouvoirs publics (contrôles et normes de rejets) et les industriels pour réduire leurs émissions et caractériser leurs pollutions résiduelles. Dans ce contexte d'amélioration des connaissances et des situations environnementales, il apparaît que les efforts entrepris doivent être poursuivis. En effet, les normes et les réglementations actuelles visent : la surveillance des concentrations totales en plomb, dans l'atmosphère à l'émission, et dans l'air ambiant pour les fractions PM₁₀ et PM_{2.5} (EU directives 96/62 et 99/30). Cependant, aucune information relative à la nature des particules vectrices de ce métal et à sa spéciation (facteur important régissant sa disponibilité et son écotoxicité), n'est demandée. Enfin, peu d'informations sont disponibles sur les fractions submicroniques (PM₁) dont le suivi a été recommandé par le réseau EMEP (Lazaridis et al., 2002).

Dans l'air ambiant, les particules riches en plomb ont généralement un diamètre inférieur à 1 µm, et toutes les valences du Pb sont représentées dans l'atmosphère (Labrot et al., 1996) : Pb⁽⁰⁾ métal, Pb^(I), Pb^(III) et Pb^(IV). Parmi les espèces de plomb les plus stables dans l'atmosphère, on distingue les oxydes de plomb tel que PbO, les carbonates de plomb tel que PbCO₃ et le Pb métallique. L'analyse des émissions de la fonderie de plomb MetalEurop par Sobanska et al., (1999) a montré de nombreuses particules de type PbS, PbSO₄, PbSO₄.PbO, Pb, α-PbO, β-PbO et PbO.PbCl₂, sous forme d'agrégats de taille micronique et submicronique.

La plupart des émissions sont hétérogènes en composition : une seule particule, même micronique, peut contenir plusieurs espèces chimiques (Batonneau et al., 2006). Ainsi, la composition chimique surfacique des PM est particulièrement importante (Batonneau et al., 2004). Pourtant, les interactions multi-spéciations

restent peu étudiées, alors qu'elles conditionnent la réactivité, la biodisponibilité et la toxicité des particules.

Ce besoin de caractérisation des spéciations métalliques émises en milieu professionnel est sous-entendu dans le code du travail. En effet, dans la réglementation des ambiances professionnelles, il existe des valeurs limites d'exposition (VLE) et des valeurs moyennes d'exposition (VME) différentes en fonction de la forme chimique de l'élément (ex : VME distinctes pour tétraéthyle et tétraméthyle de plomb). Ces travaux s'inscrivent donc dans la perspective des futures normes, qui intégreront la spéciation dans les évaluations des impacts environnementaux et sanitaires des émissions industrielles.

Enjeux scientifiques de l'objectif n°1 :

- Quelle est la spéciation du Pb dans les particules émises aux divers postes de travail d'une entreprise de recyclage de batteries ?
- Quelles sont les autres caractéristiques physico-chimiques (forme, hétérogénéité, composition élémentaire...) des particules de process ?
- Y a-t-il des différences physico-chimiques observables qui dépendent de la taille des particules et/ou du poste de travail ?

1.2.2 Objectif n° 2.

Influence de la taille des particules et de la spéciation du plomb sur la phytodisponibilité par voie atmosphérique et sur le transfert sol-plante.

(i)Transfert sol-plante

Même si le transfert sol-plante des métaux a été largement étudié (Peralta-Videa et al., 2009 ; Wang et al., 2006 ; Waisberg et al., 2004 ; Zhao et al., 2004), il reste encore des interrogations, en particulier en ce qui concerne le lien entre spéciation chimique, transfert et toxicité.

La forme chimique du plomb détermine sa mobilité dans le sol, et donc sa capacité à migrer depuis sa source jusqu'à la plante (Dahmani-Muller et al., 2001), et enfin, vers

la cible humaine. Dans le sol, il existe de nombreuses phases minérales capables de complexer le plomb :

- Carbonates : formation de cérusite (PbCO_3) et d'hydrocérusite $\text{Pb}(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_2$.
- Sulfures : formation de galène (PbS) en milieu réducteur.
- Phosphates : formation de pyromorphite ($\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$), composé très stable.
- Sulfates : formation d'anglésite (PbSO_4) après oxydation de PbS .
- Oxydes : formation de litharge ($\alpha\text{-PbO}$), et de massicot ($\beta\text{-PbO}$).

La grande variabilité des résultats de phyto-absorption observés pour le plomb (BAPPET, 2008) pourrait aussi résulter de ses interactions avec les matières organiques présentes dans la phase solide ou la solution du sol : exsudats racinaires (Schwab et al., 2005), carbone organique dissous (Staunton et al., 2002) et substances humiques (Dumat et al., 2006). Ces dernières, sont des macromolécules complexes aromatiques et aliphatiques, qui représentent la majeure partie des matières organiques des sols (Schulten et Schnitzer, 1993).

Par ailleurs, les travaux de Ruby et al. (Ruby et al., 1992, 1999), concernant les cinétiques de dissolution du plomb contenu dans des sols contaminés, ont montré, que la biodisponibilité augmente lorsque la taille des particules diminue (Figure 2).

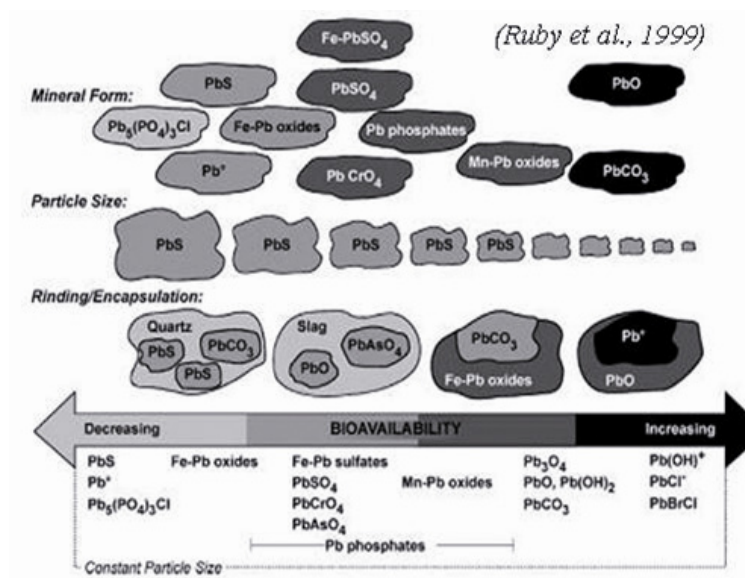


Figure 2 : Facteurs régissant la biodisponibilité du plomb : taille, spéciation et effets d'association et de matrice.

La solubilité, la taille et la spéciation d'un élément régissent sa réactivité et sa biodisponibilité. Par exemple, pour un élément comme la galène (PbS) peu réactif, si la biodisponibilité est infime pour des particules dont le diamètre est supérieur à 2.4 μm , elle devient non négligeable pour des particules plus petites. Or, une partie significative des particules étudiées dans ce projet est inférieure à 2.4 μm .

Ces connaissances générales, suggèrent que le plomb issu des particules fines, pourrait être plus disponible que le plomb présent dans des particules grossières. Cependant, à notre connaissance, aucune publication ne concerne l'étude quantitative de l'influence de la taille sur le transfert sol-plante du plomb dans le cas de particules issues de process industriels.

(ii) Transfert atmosphère - parties aériennes des plantes

Ce volet de thèse sur le transfert de particules vers la plante, directement via le dépôt atmosphérique, présente un caractère très novateur. En effet, si de nombreuses études décrivent le transfert sol-plante du plomb, aucune n'a encore démontré que ce transfert pourrait se faire par la voie atmosphérique. Cette voie est jusqu'alors négligée par rapport au transfert sol-plante. Pourtant, selon (Miquel, 2001) l'enrichissement actuel des sols en plomb provient pour 68% des retombées atmosphériques. En effet, 128 tonnes de plomb ont été émises dans l'air en France en 2006 (CITEPA, 2009). Le dépôt particulaire de métaux par voie atmosphérique sur les plantes comestibles est pourtant actuellement peu étudié (Prusty et al., 2005; Rautio et Huttunen, 2003).

Le transfert foliaire direct, via des aérosols (diamètre aérodynamique moyen des particules : 3,5 μm) a cependant déjà été démontré pour le métalloïde As (Bondada et al., 2004) et des radionucléides : ^{137}Cs , ^{85}Sr , ^{133}Ba , $^{123\text{m}}\text{Te}$, $^{239,240}\text{Pu}$ et ^{241}Am (Madoz-Escande et al., 2004; Henner et al., 2005). Ces éléments radioactifs, présents dans des aérosols, migrent rapidement dans la paroi du végétal. Le césium est rapidement absorbé et transporté dans les feuilles. Le strontium et le baryum s'adsorbent et interagissent avec la surface des plantes mais restent lessivables par de fortes pluies. Pu marque une préférence pour les organes plus âgés (cosses et vieilles racines) et ne se retrouve pas dans les organes en formation comme les jeunes cosses du petit pois. La plupart des radionucléides et des métaux lourds non essentiels peuvent emprunter les voies d'entrées des «oligoéléments» Fe, Zn, Co,

Chapitre 1 Introduction générale et Objectifs du travail expérimental

Mo, Cu, K, Ca dans les plantes (Zehnder et al., 1995; Scotti et Carini, 2000). Aussi, il paraît pertinent de s'intéresser au transfert analogue du plomb.

Des études estiment que la contamination de la chaîne alimentaire par voie atmosphérique n'est pas significative (Solgaard et al., 1978; Ter Haar, 1970). Cependant, d'autres travaux sur le blé et sur des légumes de jardins potagers ont suggéré une contamination par voie atmosphérique (Pilegaard et Johnsen, 1984; Zhao et al., 2004; Douay et al., 2008). Mais en ce qui concerne les métaux, très peu d'études ont été recensées. Elles concernent principalement les feuilles d'arbres (Watmough et al., 1999; Kozlov M.V. et al., 2000; Rautio et Huttunen, 2003) et l'herbe (Tjell et al., 1979). Les plantes potagères sont peu traitées, où dans ce cas les études disponibles sont relativement anciennes et ne bénéficient donc pas de la technicité actuelle : précision analytique et matériel de référence en particulier (Rabinowitz, 1972; Salim et al., 1992). En effet, les particules émises dans l'atmosphère par les entreprises de traitement des métaux, présentent de nombreuses spéciations du plomb : Pb, PbS, PbSO₄, PbO.PbSO₄, α-PbO, β-PbO, PbO.PbCl₂ (Sobanska et al., 1999). De même que pour les sols (cf. paragraphe précédent), le transfert et la toxicité des métaux par voie atmosphérique pourrait dépendre en particulier, de la spéciation et de la taille des émissions.

Il apparaît donc que la voie de transfert atmosphère-plante des métaux a été négligée. Des études supplémentaires concernant différents végétaux et métaux sont nécessaires, pour répondre aux nombreuses questions scientifiques qui restent en suspens.

Enjeux scientifiques de l'objectif n°2 :

- Qu'elle est influence de la taille des particules sur le transfert sol – plante ?
- Le transfert de contaminants via l'atmosphère est-il possible ? Si oui, sous quelle forme ? Particulaire, gazeux, ionique ? Quels en sont les mécanismes ?

1.2.3 Objectif n° 3.

Etude de l'impact toxicologique des émissions particulaires riches en plomb après inhalation ou ingestion.

Cette étude s'intéresse aux émissions particulaires issues d'une usine de recyclage de batteries qui véhiculent des métaux, en particulier du plomb, toxique sans seuil vis-à-vis de l'homme. La notion « sans seuil », indique que des effets toxiques sont susceptibles d'apparaître dès que cet élément est présent dans le milieu, même à très faible concentration.

Le plomb est un contaminant qui provoque d'importants dysfonctionnements physiologiques, biochimiques et comportementaux. Sa toxicité est connue depuis l'antiquité, et de nombreuses études ont exploré ses symptômes et mécanismes. Les premières descriptions des coliques et de la goutte saturnine sont attribuées à Hippocrate près de 400 ans avant Jésus-Christ (Garnier, 2005). Le plomb est neurotoxique, il peut provoquer de l'hypertension et des dommages sur les globules rouges, le système immunitaire et les reins. Chez les enfants, même à des concentrations micro-molaires dans le sang, le plomb peut altérer le développement du système nerveux, en interférant en partie, avec l'action des récepteurs de la N-méthyl-D-aspartate (NMDA) (Gurer et Ercal, 2000). Les mécanismes reconnus de la toxicité du plomb, comprennent l'inhibition de la δ -aminolaevulinic acide déshydratase (ALAD-la première étape de la biosynthèse de l'hème), conduisant à l'accumulation d'acide δ -aminolaevulinique (ALA) (Campagna et al., 1999). L'ion Pb^{2+} peut accélérer l'oxydation de l'oxy-hémoglobine en méthémoglobine (avec formation accrue de superoxyde O_2^-). Dans son second degré d'oxydation, le plomb se combine également avec les groupes thiols des protéines et à de fortes concentrations, cause la chute du taux d'antioxydant glutathion (GSH) (Gurer-Orhan et al., 2004). De plus, il perturbe l'homéostasie du calcium, en interférant probablement avec des neurotransmetteurs Ca^{2+} dépendants. En effet, Pb^{2+} peut entrer dans les cellules, en empruntant les canaux des ions Ca^{2+} (Halliwell, 2007). Afin d'expliquer un grand nombre des pathologies, on suppose que le plomb est capable d'induire un stress oxydatif dans les cellules (perturbation de l'équilibre pro-oxydant-antioxydant d'une cellule). Ce mécanisme serait à l'origine des effets du plomb au niveau du cœur (Navas-Acien et al., 2006), des reins (Garçon et al., 2004) et de l'hypertension (Vaziri et Khan, 2007).

En raison des effets néfastes avérés sur la santé, induits par le plomb, il est donc indispensable d'évaluer l'impact potentiel, pour les salariés et les riverains, des émissions de particules engendrées par les activités de recyclage des batteries. L'absorption du plomb se fait principalement par **l'inhalation** et **l'ingestion** (visage souillé par des particules, ongles, aliments, eau ou escalator muco-ciliaire : tapis

Chapitre 1 Introduction générale et Objectifs du travail expérimental

roulant organique, constitué de minuscules cils en mouvements, dont le rôle est de remonter les impuretés et les bactéries vers l'extérieur), et dans une moindre mesure par contact cutané. Ces travaux de thèse abordent les deux principales voies d'absorption citées précédemment.

Inhalation :

L'étude du dépôt des particules dans le système respiratoire, montre qu'on observe des différences importantes en fonction du diamètre des particules inhalées. Les particules inférieures à $10\ \mu\text{m}$ (PM10) sont retenues par les voies aériennes supérieures, tandis que celles inférieures à $2.5\ \mu\text{m}$ (PM2,5) et inférieures à $1\ \mu\text{m}$ (PM1) pénètrent profondément dans l'appareil respiratoire (Zhang et al., 2005). Ceci est illustré par la Figure 3.

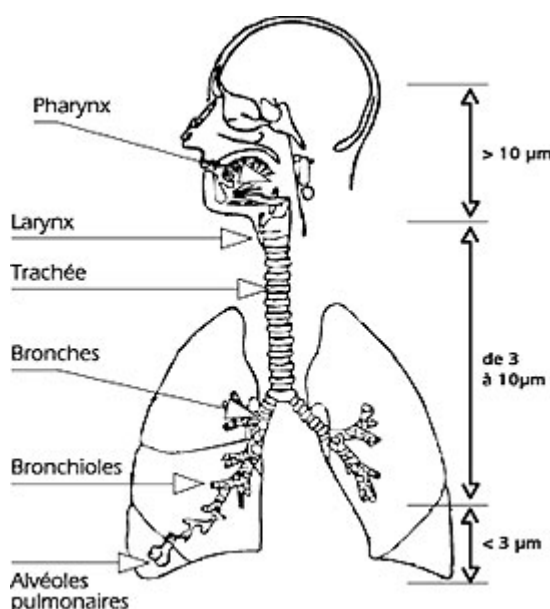


Figure 3 : Appareil respiratoire et niveau de pénétration des particules en fonction de leur diamètre aérodynamique. Source : http://www.capenvironnement.fr/img_tpp/squel4-pr-poussieres.jpg

D'après (Witschger et Fabries, 2005) on distingue habituellement cinq mécanismes de dépôt de particules dans les poumons qui sont :

- la sédimentation, liée à la gravité agissant sur les particules.
- l'impaction inertielle, qui caractérise le comportement des particules massives. (Les particules massives possèdent une inertie telle, qu'elles ne peuvent contourner un obstacle et viennent s'impacter sur la surface).
- l'interception, qui se produit lorsqu'une particule entre en contact avec une surface biologique.

- la diffusion, liée au mouvement aléatoire des particules très fines.
- l'attraction électrostatique, lorsque les particules sont chargées.

De nombreuses études épidémiologiques ont montré, que l'exposition aux particules avait des effets néfastes sur la santé (Polichetti et al., 2009) et en particulier, des effets sur le système cardiovasculaire. L'exposition aux particules les plus fines PM₁₀ et PM_{2,5}, est une cause majeure de l'augmentation des hospitalisations pour des infections myocardiales (Zanobetti et Schwartz, 2005; Ballester et al., 2006). Elle a également été reliée avec le développement de l'athérosclérose (Hoffmann et al., 2007; Yatera et al., 2008), et pourrait augmenter les risques de thrombose ainsi que les problèmes de coagulation sanguine (Baccarelli et al., 2007, 2008; Mutlu, 2007).

Ces effets néfastes dépendent de la taille des particules. En effet, à concentration égale, des particules fines développeront une surface spécifique (nombre d'atomes en surface des particules insolubles) plus importante que des particules grossières, ce qui favorise les interactions avec les molécules biologiques. De plus, les particules fines sont plus solubles, plus sensibles aux effets électrostatiques (formation d'agglomérats), et pour une masse identique, leur nombre est supérieur à celui d'une fraction grossière. D'autres caractéristiques, comme la morphologie des particules, et la spéciation chimique des métaux présents, pourraient également influencer la réactivité des particules.

En cas d'inhalation de particules de plomb, le taux de dépôt dans les poumons, déterminé par la taille des particules, et la fréquence respiratoire, est estimé à 30-50% (Lauwerys et al., 2007). Le taux d'absorption alvéolaire est quant à lui, supérieur à 90% du montant déposé. Par exemple, selon (Chamberlain, 1985) la plupart des particules de plomb provenant d'un moteur utilisant de l'essence au plomb (avec des particules de taille <1 µm) **été** absorbée dans les poumons avec une demi -vie d'environ 6 h. Lauwerys et al. (2007) ont conclu que 50% du plomb déposé dans les poumons se trouvait dans le sang 50 heures après l'inhalation. Ces données indiquent, que les particules de plomb sont assez rapidement transférées depuis les poumons vers le sang.

Le stress oxydatif serait l'un des principaux mécanismes à l'origine des effets biologiques, provoqués chez l'humain par l'exposition aux particules. Il est défini comme un excès non contrôlé de radicaux libres dérivés de l'oxygène, ou de l'azote, pouvant endommager les cellules, induire une réponse inflammatoire et plus généralement bouleverser l'équilibre oxydo-reducteur des cellules. Il va pouvoir

s'exprimer, si la production d'espèces oxydantes devient prépondérante par rapport aux mécanismes antioxydants censés limiter leur présence.

Certaines entités chimiques présentes sur les particules, et éventuellement libérées dans le milieu pulmonaire, peuvent induire un stress oxydatif dans les poumons, en produisant des « reactive oxygen species » (ROS) à partir de l'oxygène et d'autres molécules (H_2O_2 , acide ascorbique...). Ces entités sont essentiellement des métaux, des substances organiques, et dans certains cas des ROS déjà présentes sur les particules. La surface des particules, sans présenter de fonctions chimiques particulières, pourrait également catalyser la production de ROS par des mécanismes encore peu connus. Il a été ainsi mis en évidence, que des particules ultrafines de matériaux considérés comme inertes tels que le noir de carbone et le dioxyde de titane pouvaient générer du stress oxydatif en présence de cellules (Val et al., 2009).

Les ROS peuvent directement endommager les cellules de différentes façons :

- Dommages aux membranes par peroxydation lipidique.
- Dommages aux protéines.
- Rupture des brins d'ADN.
- Induction d'une réponse inflammatoire via l'émission de signaux cellulaires. Parmi ces derniers, les ROS peuvent activer le facteur de transcription « nuclear factor-kappa B » (NFkB), chargé de rendre opérationnel plusieurs gènes codant pour la production de différentes molécules pro-inflammatoires : interleukines, cytokines, molécules d'adhésions (Val et al., 2009).

Aussi dans cette thèse, l'étude de l'effet de l'inhalation des particules a été appréhendée par deux voies :

- Etude de cytotoxicité et d'activité inflammatoire in-vitro, sur des cellules épithéliales pulmonaires, afin de constater l'impact éventuel d'une exposition aiguë de ces particules.
- Etude (plus en amont) du potentiel oxydant des particules et de leur potentiel à générer des espèces réactives de l'oxygène.

Ingestion:

Environ 5 à 10% de la dose de plomb ingérée est absorbée chez l'adulte, comparativement à 40 à 50% chez l'enfant. Les cas d'intoxication aiguë au plomb sont relativement rares, et résultent, soit de l'ingestion massive de plomb via le sol ou les poussières chez l'enfant, soit de l'exposition chronique en milieu professionnel à cette substance. Dans ce dernier cas, l'ingestion a lieu via :

- Le dépôt dans le tractus gastro-intestinal d'une partie des particules évacuées de l'arbre trachéo-bronchique par l'escalator muco-ciliaire.
- Les mains et ongles souillés par des particules qui sont portés à la bouche (repas, cigarette...).
- Le visage qui intercepte des particules (barbe, cils) qui glissent ensuite jusqu'à l'entrée de la bouche (Karita et al., 1997; Far et al., 1993)

Contrairement à l'inhalation, où le plomb affecte directement le système respiratoire, les effets liés à l'ingestion sont indirects. Ils sont d'ordre neurologique, néphrologique, hématologique et osseux et surviennent lorsqu'une partie de la fraction solubilisée dans le tractus-gastro-intestinal a rejoint la circulation systémique.

Dans le sang et les tissus mous, la durée de demi-vie du plomb est d'environ 35 jours (Garnier, 2005). Il s'accumule surtout dans les os (95% chez l'adulte et 75% chez l'enfant), où sa demi-vie est de plus de 20 ans. Sa séquestration dans les os, est considérée comme un mécanisme de détoxification, qui retire du plomb libre Pb^{2+} des compartiments sanguins, sans effet néfaste sur les os. Par contre, la déminéralisation des os peut relarguer du Pb dans le sang pendant la grossesse, et l'allaitement, et, dans le cas d'ostéoporose (Bhattacharyya et al., 1995). Le plomb est excrété par l'urine (75%) et les fèces (15-20%) (Garnier, 2005).

L'étape post-ingestion, régissant les effets biologiques du plomb dans l'organisme, se situe au niveau gastro-intestinal. Dans ces compartiments, le pH évolue au cours de la digestion et les contaminants peuvent être dissous. **La bioaccessibilité** est alors définie comme la fraction du contaminant solubilisé dans les fluides digestifs. La bioaccessibilité contrôle donc la biodisponibilité orale, définie comme la fraction du contaminant qui rejoint la circulation sanguine.

La part biodisponible, ne peut être mesurée directement qu'à l'aide d'expérimentations in-vivo, coûteuses et posant des problèmes éthiques. C'est pourquoi des méthodes in-vitro ont été développées (Oomen et al., 2002). Les méthodes mises en œuvre actuellement, consistent en une extraction in vitro du polluant intégré au sol, par le biais de deux phases qui simulent le système digestif. Ces tests in-vitro sont encore en voie d'amélioration et de validation par des mesures in-vivo sur jeunes porcs (Thèse INERIS-INPL-ADEME, J.Caboche, 2006-2009).

Les travaux menés par l'INERIS (Denys et al., 2007) ou le BGS (British Geological Survey) sur des échantillons de sols industriels, ou les recommandations faites par l'US-EPA, à partir de résultats obtenus sur des phases minérales pures (US EPA, 1999), ont permis de confirmer le lien entre spéciation et biodisponibilité pour l'homme des contaminants, sans que la nature de ce lien soit établie de façon claire. A partir des études menées sur les sols, il peut être envisagé un lien identique entre la spéciation des particules et leur bioaccessibilité pour l'homme (Cotter-Howells et Thornton, 1991). La notion de bioaccessibilité, apparaît désormais incontournable dans le cadre d'hygiène professionnelle liée à des métaux ou poussières. Des recherches complémentaires sont absolument nécessaires pour acquérir des données, et mettre en place des outils d'évaluation des risques sanitaires pertinents.

Dans ces travaux, une étude de bioaccessibilité a été réalisée sur les particules échantillonnées aux divers postes de travail de la STCM, en adaptant le protocole européen unifié BARGE destiné à des sols (Cave et al., 2006).

Questions scientifiques de l'objectif n°3

- Les particules sont-elles pro-oxydantes ?
- Les particules ont-elles un effet inflammatoire et/ ou cytotoxique sur le système respiratoire ?
- Quelle est l'influence de la taille et de l'origine des particules (divers postes de travail de l'usine de recyclage de plomb) sur la bioaccessibilité du plomb qu'elles contiennent ?

1.2.4 Originalité de l'approche

Le travail de thèse effectué, constitue donc une démarche transversale sur la compréhension des mécanismes, qui conduisent au transfert du plomb des particules atmosphériques fines, vers les plantes et l'homme, avec en particulier l'étude de l'influence des caractéristiques des particules sources.

Actuellement, il n'y a pas de données quantifiées disponibles dans la littérature pour hiérarchiser l'effet taille, par rapport à l'effet spéciation dans la réactivité des particules. En raison de l'hétérogénéité des particules de process, il est particulièrement difficile de déterminer *a priori* un lien entre caractérisation des particules et réactivité. Des expériences de transfert vers les plantes, des tests de bioaccessibilité et de toxicité in-vitro peuvent alors apporter, des éléments de réponses pour discriminer les différentes particules, en termes de risque pour la biosphère, et cibler les moyens sur les postes à risques dans l'entreprise.

Enfin, la compréhension de ces mécanismes permettra :

- D'affiner les études d'évaluation des risques sanitaires en particulier pour des riverains, notamment exposés par la consommation des végétaux cultivés dans des contextes de pollution des sols et de l'air, ainsi que la mise en place d'outils pour apprécier la qualité des milieux.
- D'établir des préconisations pour la santé des travailleurs.

C'est dans cette perspective que s'inscrit notre recherche, qui se décline en trois chapitres concernant successivement (i) la caractérisation des particules sources (ii), leur transfert vers la plante via le sol et l'atmosphère (iii) et leur impact toxicologique. Ces derniers sont basés sur des publications acceptées, soumises ou en cours de soumission. Une discussion générale suivie des conclusions et perspectives de cette étude, viennent clore ce manuscrit.

En raison de la pluridisciplinarité du travail effectué, de nombreux termes techniques ont été utilisés et sont définis dans un glossaire.

1.2.5 Références bibliographiques

- Baccarelli, A., A. Zanobetti, I. Martellini, P. Grillo, L. Hou, S. Giacomini, M. Bonzini, G. Lanzani, P.M. Mannucci, P.A. Bertazzi, et J.J. Schwartz. 2007. Effects of exposure to air pollution on blood coagulation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 5(2): 252-260.
- Baccarelli, A., I. Martinelli, A. Zanobetti, P. Grillo, L. Hou, P.A. Bertazzi, P.M. Mannucci, et J. Schwartz. 2008. Exposure to Particulate Air Pollution and Risk of Deep Vein Thrombosis. *Arch Intern Med*. 168(9): 920-927.
- Ballester, F., P. Rodriguez, C. Iniguez, M. Saez, A. Daponte, I. Galan, M. Taracido, F. Arribas, J. Bellido, F.B. Cirarda, A. Canada, J.J. Guillen, F. Guillen-Grima, E. Lopez, S. Perez-Hoyos, A. Lertxundi, S. Toro, et for the EMECAS group. 2006. Air pollution and cardiovascular admissions association in Spain: results within the EMECAS project. *J Epidemiol Community Health*. 60(4): 328-336.
- BAPPET. 2008. Database of ETM in vegetables, <http://www.sites-pollues.ecologie.gouv.fr/DocumentsDiagnostics.asp#BAPPET>.
- Batonneau, Y., C. Bremard, L. Gengembre, J. Laureyns, A. Le Maguer, D. Le Maguer, E. Perdrix, et S. Sobanska. 2004. Speciation of PM10 Sources of Airborne Nonferrous Metals within the 3-km Zone of Lead/Zinc Smelters. *Environmental Science & Technology*. 38(20): 5281-5289.
- Batonneau, Y., S. Sobanska, J. Laureyns, et C. Bremard. 2006. Confocal Microprobe Raman Imaging of Urban Tropospheric Aerosol Particles. *Environmental Science & Technology*. 40(4): 1300-1306.
- Bhattacharyya, M.H., E.K. Silbergeld, E. Jeffery, A. Wilson, et L. Watson. 1995. Metal-induced osteotoxicities. p. p. 465-510. Dans *Metal toxicology*, Academic Press.
- Bondada, B.R., S. Tu, et L.Q. Ma. 2004. Absorption of foliar-applied arsenic by the arsenic hyperaccumulating fern (*Pteris vittata* L.). *Science of The Total Environment*. 332(1-3): 61-70.
- Campagna, D., G. Huel, F. Girard, J. Sahuquillo, et P. Blot. 1999. Environmental lead exposure and activity of [delta]-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) in maternal and cord blood. *Toxicology*. 134(2-3): 143-152.
- Cave, M., J. Wragg, B. Klinck, C. Grön, T. Oomen, Van de Wiele, T, I. Olsson, K. Koch, N. Reimer, N. Basta, K. Tack, et S. Casteel. 2006. Preliminary assessment of a unified bioaccessibility method for Arsenic in soils. Dans *International conference in Epidemiology and Environmental Exposure*. Paris.
- Chamberlain, A.C. 1985. Prediction of Response of Blood Lead to Airborne and Dietary Lead from Volunteer Experiments with Lead Isotopes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 224(1235): 149-182.
- CITEPA. 2009. CITEPA, <http://www.citepa.org/>.
- Cotter-Howells, J., et I. Thornton. 1991. Sources and pathways of environmental lead to children in a Derbyshire mining village. *Environmental Geochemistry and Health*. 13(2): 127-135.
- Dahmani-Muller, H., F. van Oort, et M. Balabane. 2001. Metal extraction by *Arabidopsis halleri* grown on an unpolluted soil amended with various metal-bearing solids: a pot experiment. *Environmental Pollution*. 114(1): 77-84.
- Denys, S., K. Tack, J. Caboche, et P. Delalain. 2009. Bioaccessibility, solid phase distribution, and speciation of Sb in soils and in digestive fluids. *Chemosphere*. 74(5): 711-716.
- Donisa, C., R. Mocanu, E. Steinnes, et A. Vasu. 2000. Heavy Metal Pollution by Atmospheric Transport in Natural Soils from the Northern Part of Eastern Carpathians. *Water, Air, & Soil Pollution*. 120(3): 347-358.
- Douay, F., H. Roussel, C. Pruvot, A. Lorette, et H. Fourier. 2008. Assessment of a remediation technique using the replacement of contaminated soils in kitchen gardens nearby a former lead smelter in Northern France. *Science of The Total Environment*. 401(1-3): 29-38.

- Dumat, C., K. Quenea, A. Bermond, S. Toïnen, et M. Benedetti. 2006. Study of the trace metal ion influence on the turnover of soil organic matter in cultivated contaminated soils. *Environmental Pollution*. 142(3): 521-529.
- Far, H.S., N.T. Pin, C.Y. Kong, K.S. Fong, C.W. Kian, et C.K. Yan. 1993. An evaluation of the significance of mouth and hand contamination for lead absorption in lead-acid battery workers. *International Archives of Occupational and Environmental Health*. 64(6): 439-443.
- Fedlheim, D.L., et C.A. Foss. 2001. *Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Applications*. 1er éd. CRC Press.
- Fernandez Espinosa, A.J., et S.R. Oliva. 2006. The composition and relationships between trace element levels in inhalable atmospheric particles (PM10) and in leaves of Nerium oleander L. and Lantana camara L. *Chemosphere*. 62(10): 1665-1672.
- Garçon, G., B. Leleu, F. Zerimech, T. Marez, J. Haguenoer, D. Furon, et P. Shirali. 2004. Biologic markers of oxidative stress and nephrotoxicity as studied in biomonitoring of adverse effects of occupational exposure to lead and cadmium. *J. Occup. Environ. Med.* 46(11): 1180-1186.
- Garnier. 2005. Toxicité du plomb et de ses derives. p. 67 – 88. Dans *EMC-Toxicologie Pathologie 2*.
- Gurer, H., et N. Ercal. 2000. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radical Biology and Medicine*. 29(10): 927-945.
- Gurer-Orhan, H., H.U. Sabir, et H. Ozgünes. 2004. Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. *Toxicology*. 195(2-3): 147-154.
- Halliwel, B. 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 35(5): 1147.
- Henner, P., C. Colle, et M. Morello. 2005. Retention and translocation of foliar applied 239,240Pu and 241Am, as compared to 137Cs and 85Sr, into bean plants (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Environmental Radioactivity*. 83(2): 213-229.
- Hernández-Ochoa, I., G. García-Vargas, L. López-Carrillo, M. Rubio-Andrade, J. Morán-Martínez, M.E. Cebrián, et B. Quintanilla-Vega. 2005. Low lead environmental exposure alters semen quality and sperm chromatin condensation in northern Mexico. *Reproductive Toxicology*. 20(2): 221-228.
- Hoffmann, B., S. Moebus, S. Mohlenkamp, A. Stang, N. Lehmann, N. Dragano, A. Schmermund, M. Memmesheimer, K. Mann, R. Erbel, K. Jockel, et for the Heinz Nixdorf Recall Study Investigative Group. 2007. Residential Exposure to Traffic Is Associated With Coronary Atherosclerosis. *Circulation*. 116(5): 489-496.
- Hong, S., J. Candelone, C.C. Patterson, et C.F. Boutron. 1996. History of Ancient Copper Smelting Pollution During Roman and Medieval Times Recorded in Greenland Ice. *Science*. 272(5259): 246-249.
- Jarup, L. 2003. Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull*. 68(1): 167-182.
- Kallos, G., M. Astitha, P. Katsafados, et C. Spyrou. 2007. Long-Range Transport of Anthropogenically and Naturally Produced Particulate Matter in the Mediterranean and North Atlantic: Current State of Knowledge. *Journal of Applied Meteorology and Climatology*. 46(8): 1230-1251.
- Karita, K., T. Shinozaki, K. Tomita, et E. Yano. 1997. Possible oral lead intake via contaminated facial skin. *Science of The Total Environment*. 199(1-2): 125-131.
- Kozlov M.V., Haukioja E., Bakhtiarov A.V., Stroganov D.N., et Zimina S.N. 2000. Root versus canopy uptake of heavy metals by birch in an industrially polluted area: contrasting behaviour of nickel and copper. *Environmental Pollution*. 107: 413-420.
- Labrot, F., D. Ribera, M. Saint-Denis, et J. Narbonne. 1996. Le plomb dans l'environnement: sources, mécanismes de transfert et effets biologiques. p. 3-17. Dans *Méthodes d'Analyse du Plomb dans l'Environnement*. Lavoisier éditeur. Paris.
- Lauwerys, R.R., V. Haufroid, P. Hoet, et D. Lison. 2007. *Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles*. Elsevier Masson.

- Lazaridis, M., A. Semb, S. Larssen, A. Hjellbrekke, O. Hov, J. Hanssen, J. Schaug, et K. Torseth. 2002. Measurements of particulate matter within the framework of the European Monitoring and Evaluation Programme (EMEP) - I.... *The Science of the Total Environment*. 285(1): 209-235.
- Madoz-Escande, C., P. Henner, et T. Bonhomme. 2004. Foliar contamination of *Phaseolus vulgaris* with aerosols of ¹³⁷Cs, ⁸⁵Sr, ¹³³Ba and ^{123m}Te: influence of plant development stage upon contamination and rain. *Journal of Environmental Radioactivity*. 73(1): 49-71.
- Miquel, G. 2001. Effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé. *Parlement*.
- Mutlu, G.M. 2007. Ambient particulate matter accelerates coagulation via an IL-6-dependent pathway. *J Clin Invest*. 117(10): 2952-2961.
- Navas-Acien, A., E. Guallar, E.K. Silbergeld, et S.J. Rothenberg. 2006. Lead Exposure and Cardiovascular Disease - a Systematic Review. *Environ. Health Perspect*.
- Ohmsen, G.S. 2001. Characterization of fugitive material within a primary lead smelter. *J Air Waste Manag Assoc*. 51(10): 1443-1451.
- Oomen, A.G., A. Hack, M. Minekus, E. Zeijdner, C. Cornelis, G. Schoeters, W. Verstraete, T. Van de Wiele, J. Wragg, C.J.M. Rompelberg, A.J.A.M. Sips, et J.H. Van Wijnen. 2002. Comparison of Five In Vitro Digestion Models To Study the Bioaccessibility of Soil Contaminants. *Environ. Sci. Technol*. (3326-3334).
- Peralta-Videa, J.R., M.L. Lopez, M. Narayan, G. Saupe, et J. Gardea-Torresdey. 2009. The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: Implications for the food chain. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 41(8-9): 1665-1677.
- Pilegaard, K., et I. Johnsen. 1984. Heavy Metal Uptake from Air and Soil by Transplanted Plants of *Achillea millefolium* and *Hordeum vulgare*. *Ecological Bulletins*. (36): 97-102.
- Polichetti, G., S. Cocco, A. Spinali, V. Trimarco, et A. Nunziata. 2009. Effects of particulate matter (PM₁₀, PM_{2.5} and PM₁) on the cardiovascular system. *Toxicology*. 261(1-2): 1-8.
- Prospero, J.M. 1999. Long-range transport of mineral dust in the global atmosphere: Impact of African dust on the environment of the southeastern United States. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96(7): 3396-3403.
- Prusty, B.A.K., P.C. Mishra, et P.A. Azeez. 2005. Dust accumulation and leaf pigment content in vegetation near the national highway at Sambalpur, Orissa, India. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 60(2): 228-235.
- Rabinowitz, M. 1972. Plant uptake of soil and atmospheric lead in southern California.
- Rautio, P., et S. Huttunen. 2003. Total vs. internal element concentrations in Scots pine needles along a sulphur and metal pollution gradient. *Environmental Pollution*. 122(2): 273-289.
- Ruby, M.V., A. Davis, J.H. Kempton, J.W. Drexler, et P.D. Bergstrom. 1992. Lead Bioavailability - Dissolution Kinetics under Simulated Gastric Conditions. *Environmental Science & Technology*. 26(6): 1242-1248.
- Ruby, M.V., R. Schoof, W. Brattin, M. Goldade, G. Post, M. Harnois, D.E. Mosby, S.W. Casteel, W. Berti, M. Carpenter, D. Edwards, D. Cragin, et W. Chappell. 1999. Advances in Evaluating the Oral Bioavailability of Inorganics in Soil for Use in Human Health Risk Assessment. *Environmental Science & Technology*. 33(21): 3697-3705.
- Ruby, M.V., A. Davis, R. Schoof, S. Eberle, et C.M. Sellstone. 1996. Estimation of Lead and Arsenic Bioavailability Using a Physiologically Based Extraction Test. *Environmental Science & Technology*. 30(2): 422-430.
- Salim, R., J. Hagemeyer, M.M. Al-Subu, A. Atallah, et L. Chenavier. 1992. Effects, on growth and uptake distribution, of root and foliar treatments of marrow plants with cadmium and lead solutions. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*. 27(8): 2173.
- Schulten, H.-., et M. Schnitzer. 1993. A state of the art structural concept for humic substances. *Naturwissenschaften*. 80(1): 29-30.

Chapitre 1 Introduction générale et Objectifs du travail expérimental

Schwab, A., Y. He, et M. Banks. 2005. The influence of organic ligands on the retention of lead in soil. *Chemosphere*. 61(6): 856-866.

Scotti, I.A., et F. Carini. 2000. Heavy metal effect on uptake and translocation of ¹³⁴Cs and ⁸⁵Sr in aubergine plants. *Journal of Environmental Radioactivity*. 48(2): 183-190.

Sobanska, S., N. Ricq, A. Laboudigue, R. Guillermo, C. Bremard, J. Laureyns, J.C. Merlin, et J.P. Wignacourt. 1999. Microchemical Investigations of Dust Emitted by a Lead Smelter. *Environmental Science & Technology*. 33(9): 1334-1339.

Solgaard, P., A. Aarkrog, J. Fenger, H. Flyger, et A.M. Graabaek. 1978. Decrease in content of lead in Danish cereals. *Nature*. 272(5651): 346-347.

Staunton, S., C. Dumat, et A. Zsolnay. 2002. Possible role of organic matter in radiocaesium adsorption in soils. *Journal of Environmental Radioactivity*. 58(2-3): 163-173.

Ter Haar, G. 1970. Air as a source of lead in edible crops. *Environmental Science & Technology*. 4(3): 226-229.

Tjell, J.C., M.F. Hovmand, et H. Mosbæk. 1979. Atmospheric lead pollution of grass grown in a background area in Denmark. *Nature*. 280(5721): 425-426.

Val, S., S. Hussain, S. Boland, R. Hamel, A. Baeza-Squiban, et F. Marano. 2009. Carbon black and titanium dioxide nanoparticles induce pro-inflammatory responses in bronchial epithelial cells: Need for multiparametric evaluation due to adsorption artifacts. *Inhalation Toxicology*. 21(s1): 115.

Vaziri, N.D., et M. Khan. 2007. Interplay of reactive oxygen species and nitric oxide in the pathogenesis of experimental lead-induced hypertension. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 34(9): 920-925.

Waisberg, M., W.D. Black, C.M. Waisberg, et B. Hale. 2004. The effect of pH, time and dietary source of cadmium on the bioaccessibility and adsorption of cadmium to/from lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. *Ostinata*). *Food and Chemical Toxicology*. 42(5): 835-842.

Wang, G., M. Su, Y. Chen, F. Lin, D. Luo, et S. Gao. 2006. Transfer characteristics of cadmium and lead from soil to the edible parts of six vegetable species in southeastern China. *Environmental Pollution*. 144(1): 127-135.

Watmough, S.A., T.C. Hutchinson, et R.D. Evans. 1999. The distribution of ⁶⁷Zn and ²⁰⁷Pb applied to white spruce foliage at ambient concentrations under different pH regimes. *Environmental and Experimental Botany*. 41(1): 83-92.

Witschger, O., et J. Fabries. 2005. Particules ultra-fines et santé au travail 1- caractéristiques et effets potentiels sur la santé.

Yatera, K., J. Hsieh, J.C. Hogg, E. Tranfield, H. Suzuki, C. Shih, A.R. Behzad, R. Vincent, et S.F. van Eeden. 2008. Particulate matter air pollution exposure promotes recruitment of monocytes into atherosclerotic plaques. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 294(2): H944-953.

Yokel, R.A., S.M. Lasley, et D.C. Dorman. 2006. The speciation of metals in mammals influences their toxicokinetics and toxicodynamics and therefore human health risk assessment. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 9(1): 63-85.

Zanobetti, A., et J. Schwartz. 2005. The Effect of Particulate Air Pollution on Emergency Admissions for Myocardial Infarction: A Multicity Case-Crossover Analysis. *Environmental Health Perspectives*. 113(8): 978-982.

Zehnder, H.J., P. Kopp, J. Eikenberg, U. Feller, et J.J. Oertli. 1995. Uptake and transport of radioactive cesium and strontium into grapevines after leaf contamination. *Radiation Physics and Chemistry*. 46: 61-69.

Zhang, Z., C. Kleinstreuer, J. Donohue, et C. Kim. 2005. Comparison of micro- and nano-size particle depositions in a human upper airway model. *Journal of Aerosol Science*. 36(2): 211-233.

Zhao, F.J., M.L. Adams, C. Dumont, S.P. McGrath, A.M. Chaudri, F.A. Nicholson, B.J. Chambers, et A.H. Sinclair. 2004. Factors affecting the concentrations of lead in British wheat and barley grain. *Environmental Pollution*. 131(3): 461-468.

Chapitre 2

Matériels et Méthodes

Dans ces travaux de thèse, des expériences de caractérisation des sources, de mesure du transfert du plomb dans le système sol-plante et atmosphère-plante ainsi que des expériences de toxicologie ont été conduites. Ce chapitre présente l'ensemble des techniques et protocoles utilisés. Des détails supplémentaires sont fournis dans les différents chapitres ciblés.

2.1. Site d'étude et échantillonnage

Ce chapitre vise tout d'abord à donner des informations concernant les activités de l'entreprise partenaire du travail de thèse. Pourquoi cette entreprise est amenée à réaliser des études concernant son impact sur l'environnement ? Plusieurs éléments présentés dans ce chapitre répondront à cette question : des aspects réglementaires, la situation de l'usine en zone urbaine, etc.

Il vise également à présenter la stratégie d'échantillonnage, de ségrégation par taille et de stockage des particules de process dont les caractéristiques et la réactivité ont ensuite été déterminées.

2.1.1 Présentation de l'entreprise

La Société de Traitements Chimiques des Métaux, (STCM, www.stc-metaux.com) est une entreprise de recyclage de plomb. C'est une Installation classée pour la protection de l'environnement (ICPE).

Elle fabrique à partir de plomb usagé des alliages de plomb à la demande (calcium – antimoine – étain...). Les principaux débouchés sont les batteries, la balistique, les protections ionisantes et le bâtiment.

Au départ société à caractère familial, la STCM a été rachetée en 1993 par le groupe allemand METALLGESELLSCHAFT et en 1996 par le groupe américain QUEXCO, par l'intermédiaire de sa filiale anglaise ECOBAT Technologies PLC. La société QUEXCO produit 25% du plomb mondial recyclé (aussi appelé plomb de deuxième fusion). La STCM, possède deux usines, une à Bazoches les Gallerandes (45) et l'autre à Toulouse (31). Il y a 34 employés sur le site de Toulouse. L'entreprise est particulièrement volontaire sur les aspects environnement et santé.

En effet, la STCM est certifiée **ISO 9001** et **ISO/TS 16949** (à la demande de clients automobile) depuis août 2003 pour son système de management de la qualité

(SMQ). Certifiée **ISO 14001** depuis septembre 1999 puis re-certifiée conjointement à **OHSAS 18001** depuis décembre 2002 pour ses systèmes de management de l'environnement et de management de la santé et de la sécurité au travail (respectivement SME et SMSST), la STCM se prépare désormais à la mise en place d'un système de management intégré (SMI).

2.1.2 L'usine STCM de Toulouse : situation

Localisée 30-32 Avenue de Fondeyre, 31200 Toulouse sur une superficie de 24000 m², l'usine de la STCM était située lors de sa création en 1952, dans une zone éloignée de toute habitation.

Avec le temps, une zone industrielle s'est développée, faisant du nord de Toulouse un des pôles industriels de la ville. Aujourd'hui, à proximité, sont situés un dépôt de carburant (Site Seveso II), mais également une laiterie et des lotissements. Cet environnement est décrit sur la figure ci-dessous.

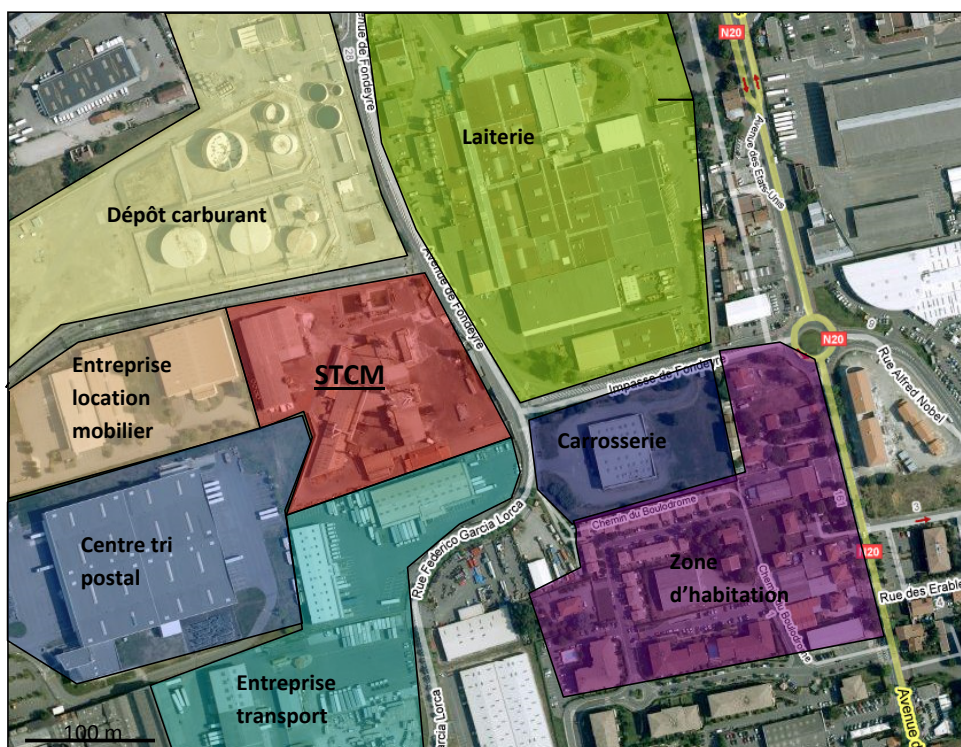


Figure 4 : Environnement de la STCM : entreprises et habitations. source : www.googlemaps.com pour le fond de carte

2.1.3 Les différents processus réalisés en ateliers de production :

La production annuelle à la STCM Toulouse est de 19 000 tonnes de plomb.

La matière première principale du processus de l'usine est la batterie automobile (25 000 T de batteries traitées). De ces batteries sera extrait le plomb qui servira ensuite à la fabrication de lingots. On utilise également en moins grande quantité du « vieux plomb », c'est-à-dire des morceaux de plomb comme des tuyaux, des gaines de câbles, des équilibreurs de voitures...

Le procédé de recyclage de plomb est décrit par le schéma suivant (Figure 5) :

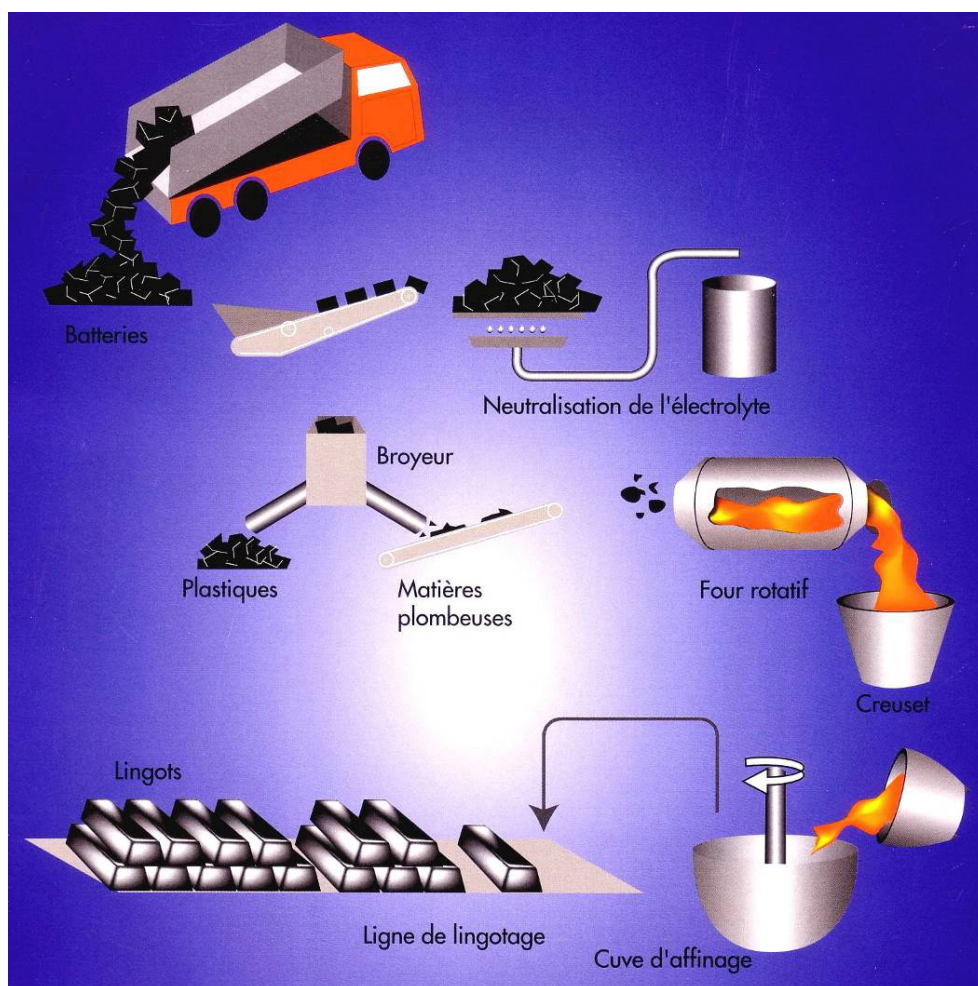


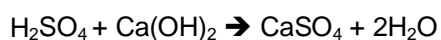
Figure 5 : Schéma des opérations suivies dans l'usine (source : STCM-APSM)

On y observe en particulier les quatre étapes nécessaires au recyclage du plomb (broyage, fusion...). Ces étapes sont réparties sur 3 bâtiments dans l'enceinte de l'usine dont les paragraphes suivants détaillent les réactions mises en jeu.

2.1.3.1 Le site de broyage

Les batteries sont cassées (cadence 12T/H) afin d'en séparer les matières constitutives :

- la pâte de plomb qui provient de la matière active de la batterie.
- le plomb métallique des grilles et connexions.
- le polypropylène de l'enveloppe de la batterie qui est revendu à des recycleurs de matières plastiques.
- les séparateurs en matières plastiques diverses qui seront incinérés.
- l'électrolyte acide n'est pas valorisé car il est très dilué ; il est neutralisé sur place :



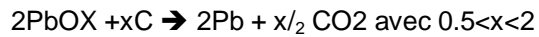
⇒ Ces opérations sont réalisées sous arrosage continu afin de limiter l'envolement de particules diffuses. Les eaux et les boues chargées en métaux et acide sont recueillies et traitées dans une station de traitement des eaux internes à l'usine (300 m³/jour).

2.1.3.2 L'atelier des fours : fusion-réduction des batteries

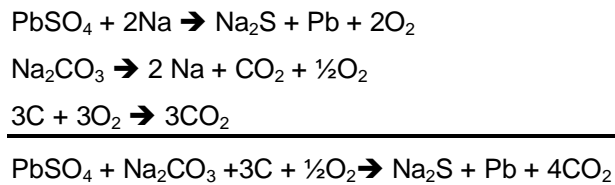
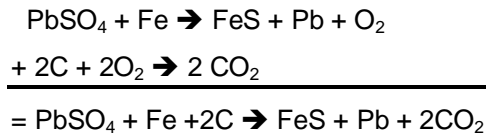
Les matières plombeuses résultant du broyage des batteries représentent un mélange de plusieurs substances: plomb métallique, oxyde de plomb (PbO), sulfate de plomb (PbSO₄) et autres métaux tels que calcium (Ca), cuivre (Cu), antimoine (Sb), arsenic (As), et étain (Sn) ...Pour isoler le plomb métallique, un procédé pyrométallurgique dit de « fusion-réduction » permet de réduire la matière première issue du broyage à 800°C (grâce à un brûleur à oxygène) dans 3 fours tournants.

Ainsi les oxydes et les sulfates de plomb présents dans les batteries sont réduits en plomb métallique (réactions chimiques suivantes) qui peut ensuite être coulé pour la fabrication de « pains de plomb » de 1,8 ou 2,4 T.

Réduction des oxydes



Réduction des sulfates



Le site possède 3 Fours identiques d'une capacité de 4,5 m³ qui permettent de traiter 30 Tonnes de plomb par jour dans chacun.



Figure 6 : Four rotatif.

Le plomb « d'œuvre » obtenu selon ce procédé titre à 98,5 % de plomb. Pour augmenter la pureté du métal (le plomb « doux » commercial titre 99,96 % Pb) ou obtenir un alliage, il faut ensuite l'affiner.

2.1.3.3 L'atelier d'affinage

L'affinage a pour objectif d'éliminer les impuretés dans le plomb provenant du four et d'y inclure éventuellement des éléments en fonction des cahiers des charges définis par les clients.

- Les « pains de plomb » analysés sont fondus dans des cuves (5 Cuves de 30 et 80 T) entre 300 et 500 °C (NB : le point de fusion du plomb de 327 °C).
- Un décuivrage est effectué en présence de soufre élémentaire à 340°C.
- Les excès d'étain, d'antimoine et d'arsenic sont éliminés sélectivement à respectivement 390°C, 400°C et 420°C par oxydation avec un mélange de soude NaOH(2M) et de nitrate de sodium NaNO₃(M) .
- L'excès possible de zinc est supprimé entre 360°-400°C avec du chlorure d'ammonium.
- Un lavage final est réalisé avec de la soude pour éliminer toutes les impuretés restantes.
- Un ajout d'éléments est réalisé selon les alliages commandés par le client : étain, arsenic, sélénium ou calcium.
- Le processus s'arrête lorsque la composition désirée est obtenue (contrôle par spectrométrie d'émission). Une « lingotière » sur roue circule devant les cuves d'affinages et sert à couler le plomb et à cercler les lingots de 35 kg par piles de 1 Tonne. Ces piles sont ensuite expédiées chez les clients par camion de 25 Tonnes.

2.1.4 Météorologie de la zone

La région Toulousaine se trouve à la confluence de trois zones climatiques tempérées : influence océanique à l'ouest, méditerranéenne à l'Est et continentale au Nord.

Ces influences se traduisent généralement par des hivers frais, des printemps très pluvieux avec orages violents (voir grêles intenses 2008-2009) suivis d'étés secs et chauds et d'un automne doux et ensoleillé.

Les vents qui prédominent à Toulouse sont orientés :

- Nord-ouest/ouest (50% année). Le vent d'ouest amène l'humidité de l'Atlantique, le vent du nord est froid et sec.
- Sud-est aussi appelé vent d'autan (25% année).

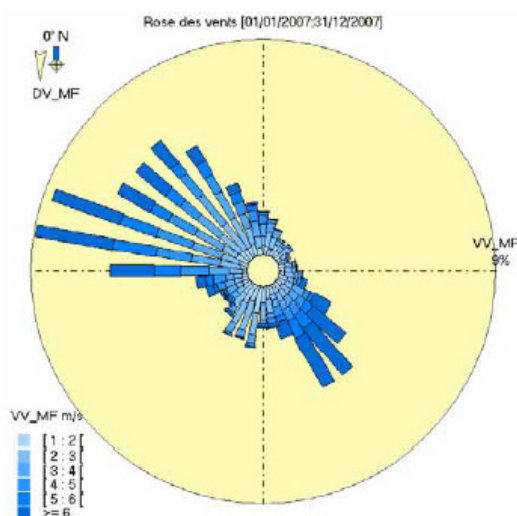


Figure 7 : rose des vents Station Blagnac, année 2007, DV : direction des vents, VV : vitesse du vent : bleu clair (1-2 m/s) à bleu foncé (5-6 m/s) (source Oramip)

Ce diagramme renseigne sur les directions, sens et intensité (expliciter VV..) des vents dominants. Des mesures journalières ont été effectuées pendant les expériences d'exposition des végétaux aux retombées atmosphériques.

Le vent Nord-Ouest/Ouest étant prédominant, les émissions des industries retombent majoritairement au Sud-Est/Est, zone urbaine et dans une moindre mesure au Nord-Ouest (zone industrielle, rocade) lorsque le vent d'Autan souffle. La zone d'iso-concentrations des retombées de l'usine a été délimitée par un organisme indépendant et est représentée Figure 8 :

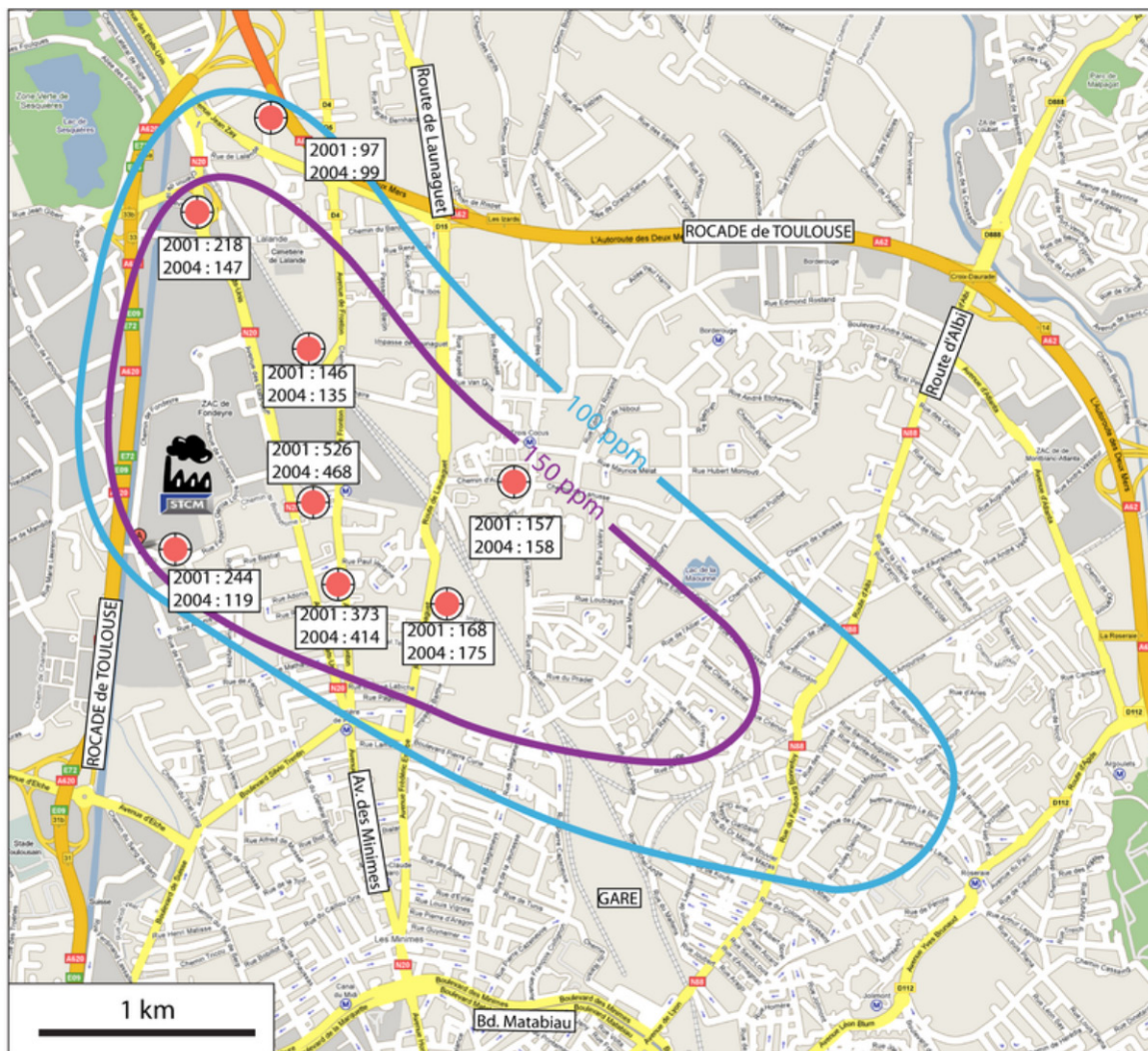


Figure 8 : Courbes d'iso-concentration en plomb 0-25 cm (violet : 150 mg/kg, bleu : 100 mg/kg) autour de l'usine et concentrations ponctuelles mesurées en 2001 et 2004. source : www.googlemaps.com pour le fond de carte

Des prélèvements de sol effectués entre 2001 et 2004 indiqués sur la Figure 8 montrent que les concentrations en plomb dans les sols sont stables dans le temps, et que la contamination date de la période où les cheminées n'étaient pas équipées de filtres. Il faut aussi noter qu'avant l'année 2000, du plomb était rajouté dans l'essence. Ainsi, la contamination pourrait être en grande partie due au trafic routier des rocade. Pour distinguer, à l'avenir, le plomb dans le sol due à l'activité de l'entreprise et celui provenant du trafic, il faudrait mesurer les rapports isotopiques qui permettent de tracer une source.

2.1.5 Emissions de l'usine.

Les risques potentiels pour l'environnement et la santé humaine, liés aux activités des industries de recyclage des métaux sont attribués principalement, à la pollution de l'air qui engendre des retombées atmosphériques métalliques et dans une faible mesure à une pollution dans les eaux en cas de rejet de l'usine. En France, les rejets de plomb dans l'air et l'eau sont réglementés. Les concentrations maximales admissibles sont fixées à $0.5 \mu\text{gPb}/\text{m}^3$ dans l'air avec $0.25\mu\text{gPb}/\text{m}^3$ comme objectif qualité (décret 98-360) et $25\mu\text{g}/\text{l}$ dans l'eau (décret 2001-1220). Cependant des situations accidentelles peuvent se produire. De plus les règlements sont principalement focalisés sur les concentrations totales en plomb, alors que de nombreux facteurs peuvent influencer les transferts abiotiques et biotiques.

Ce travail de thèse s'est focalisé sur les émissions atmosphériques pour lesquelles on distingue deux catégories :

- Les émissions canalisées de l'usine émises au niveau des fours et de l'affinage, qui sont filtrées et sont majoritairement composées de poussières, oxydes de soufre, dioxyde de carbone, chlorures et métaux. L'arrêté préfectoral fixé par l'administration en fonction de la nomenclature ICPE autorise l'entreprise à émettre jusqu'à 800kg de poussières et 500 kg de plomb par an. En 2008, l'usine a émis 261.9kg de poussières et 27.9kg de plomb. Les émissions des cheminées retombent majoritairement dans la zone décrite dans le paragraphe « météorologie 1.1.4 ».
- Les émissions diffuses des ambiances des ateliers, qui sont émises pendant les opérations de chargement et de coulée des fours, pendant certaines phases de l'affinage, et enfin lors des opérations de manutention. Ces émissions contribuent à l'enrichissement en métaux des atmosphères des ateliers, et sont pour une partie évacuées vers l'environnement à chaque ouverture des locaux. Ces poussières soumises à des réenvolements impactent un périmètre proche de l'usine et sont en grande partie confinées par les murs de l'usine (hauteur 3m). Les émissions diffuses sont supérieures aux émissions canalisées (facteur de 10 à 20 suivant étude de l'Observatoire Régional de la Qualité de l'Air en Midi-Pyrénées (ORAMIP)). Ainsi on peut estimer que les activités du site émettent entre 300 kg et 600 kg de plomb par an.

2.1.6 Collecte des particules dans l'usine

Cette stratégie d'échantillonnage a été pensée en fonction de nos objectifs scientifiques qui étaient d'étudier les caractéristiques des particules par atelier afin de renseigner les risques pour l'environnement et la santé des salariés de l'entreprise. Elle a ensuite été élaborée à partir des informations collectées lors de visites de l'usine et en s'appuyant sur l'expérience des dirigeants du site.

Elle intègre le choix des substances à investiguer et le choix des lieux de prélèvement. Elle détermine également les modalités de prélèvement, de conservation, de transport et d'analyse des échantillons.

2.1.6.1 Localisation des sources :

Dans un premier temps, les sources de particules émises par le procédé ont été localisées.

Trois bâtiments sont présents sur le site de l'usine correspondant chacun à une étape du process :

- Unité de broyage des batteries, réalisé sous arrosage continu. Les conditions humides du procédé limitent fortement les émissions de particules et sont susceptibles de modifier fortement et rapidement la spéciation des particules en présence. Aussi, cette source n'a pas été prioritaire dans les prélèvements car mineure et sujette à de fortes variations.
- Unité des fours où la fusion-réduction du plomb est réalisée. Dans ce bâtiment, deux sources principales de particules ont été identifiées et échantillonnées :
 1. L'ambiance de l'atelier soumise à des rejets de particules lors de l'ouverture des fours et des ré-envolements provoqués par la circulation des engins de charge dans l'enceinte.
 2. Evacuation des effluents des fours par des cheminées équipées de manches filtrantes (Figure 9).

Une troisième source de particules avait été identifiée dans cet atelier : les émissions canalisées dues à l'assainissement (hottes ventilées au dessus de l'ouverture des fours). Cette source est mineure en particules émises par rapport aux effluents des fours et n'a pas fait l'objet de suivi pendant la thèse.

- Unité d'affinage où le « plomb d'œuvre » est épuré des composés non désirés et enrichi en éléments souhaités. Dans ce bâtiment, une source a été échantillonnée :

3. L'ambiance de l'atelier soumise à des rejets de particules des cuves d'affinage.

Dans cette unité, il n'y a pas d'émissions canalisées process mais uniquement des émissions canalisées dues à l'assainissement : ces particules sont ensuite captées et chaulées avant envoi en centre de déchets. N'étant pas émises dans l'environnement, cette source n'a pas été suivie.

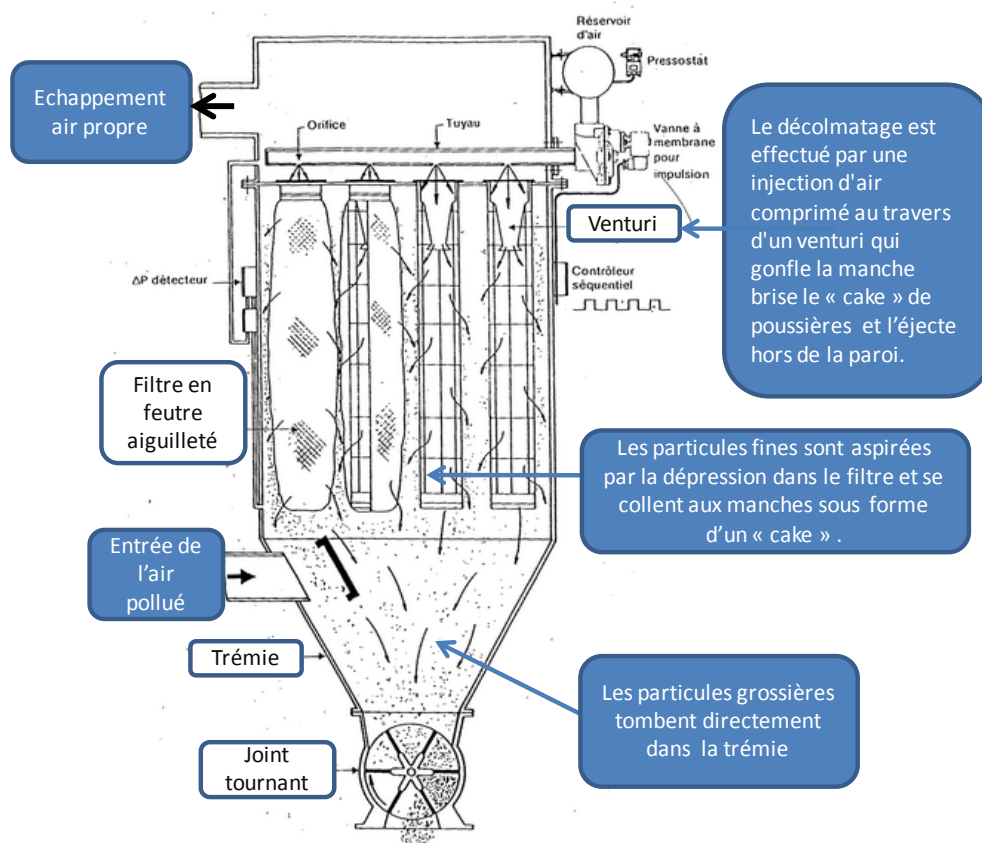


Figure 9 : manche filtrante du four. (source STCM-ASPM)

2.1.6.2 Mise en œuvre :

Ainsi, trois sources ont été identifiées et échantillonnées :

- Pour les ambiances des fours et de l'affinage, les poussières ont été prélevées sur les poutres horizontales situées à 2 mètres de hauteur. Les poutrelles avaient été nettoyées trois mois auparavant, donc les particules récoltées correspondaient à trois mois de dépôt. Ces particules correspondent au diffus « vrai », c'est-à-dire aux particules diffuses redéposées dans l'enceinte de la pièce qui n'ont pas été aspirées par les hottes d'assainissement.
- Pour les émissions canalisées des fours, la collecte n'était pas possible en sortie de cheminée à cause des faibles quantités récupérées. Cela aurait impliqué un prélèvement prolongé incompatible avec les conditions de température en sortie des filtres (la température faisant gondoler et colmater les filtres en cas de prélèvement prolongé). Nous avons donc échantillonné avant filtration, ceci signifiant que les particules prélevées sont représentatives des émissions canalisées avec en plus des particules plus grossières qui auraient été stoppées par les manches filtrantes (diamètre de coupure < 10 μ m). Cependant remise en suspension ultérieure nous permet d'obtenir les particules inférieures à 10 μ m.

Les particules ont été récupérées dans des sacs en polyéthylène (PE, Zyploc exempts de métaux), puis enfermées dans des fûts hermétiques opaques. Après transport au laboratoire, les échantillons ont été conservés en chambre froide à 4°C, sans lumière, et avec ajout d'un gel dessicant, afin de limiter toute modification de la spéciation des métaux potentiellement présents dans ces particules.

La Figure 10 localise les prélèvements et des photos de terrain (Figure 11) précisent les emplacements exacts des prélèvements.



Figure 10 : Schéma localisant les trois sources de particules échantillonnées



Filter process four où est localisé le refus des manches filtrantes des cheminées. Poussières prélevées sur les bords des fenêtres, atelier four. Dépôt prélevé sur une poutrelle, atelier affinage.

Figure 11 : photos de la campagne d'échantillonnage.

2.1.7 Remise en suspension des particules collectées

2.1.7.1 Principe

Un des objectifs de la thèse était de corrélérer la spéciation et la réactivité avec la taille des particules. C'est pourquoi, nous avons choisi de remettre en suspension par impaction les particules prélevées dans l'usine, afin de les ségréguer suivant leurs classes granulométriques.

En général, les particules de process ont des formes irrégulières. Il est donc difficile de mesurer leur diamètre géométrique et de les séparer selon ce critère. Pour les particules atmosphériques, la métrologie employée est le **diamètre aérodynamique**, applicable quelque soit la forme de la particule. Ce dernier est défini comme le diamètre d'une sphère de densité de 1g.cm^3 , qui a la même vitesse de chute que la particule en question (Mark, 1998). La relation qui le relie à son diamètre équivalent géométrique est :

$$Da = Dg \times \sqrt{\frac{\rho_p}{\chi \cdot \rho_0}}$$

Avec D_a et D_g , diamètres aérodynamique et géométrique, respectivement.
 ρ_p , masse volumique de la particule en g.cm^{-3} , ex $\rho_p(\text{PbSO}_4) = 6.33 \text{ g.cm}^{-3}$,
 $\rho_0 = 1 \text{ g.cm}^{-3}$.

χ , facteur de forme dynamique. C'est le rapport entre la force ~~inertiale~~ de la particule irrégulière considérée et celle d'une particule sphérique ayant la même masse et la même vitesse de sédimentation dans l'air tout en étant composée du même matériau. $\chi = 1$ pour des sphères.

L'impacteur inertiel en cascade permet de séparer les particules en fonction de leur diamètre aérodynamique. Les particules aspirées à un débit constant passent à travers des buses dont la sortie est dirigée vers un collecteur (conf Figure 12). Le tri s'effectue à énergie cinétique (E_c) constante des particules selon l'équation :

$$E_c = \frac{1}{2} m_i v_i^2$$

Avec m_i la masse des particules et v_i , leur vitesse à l'étage d'impaction i .

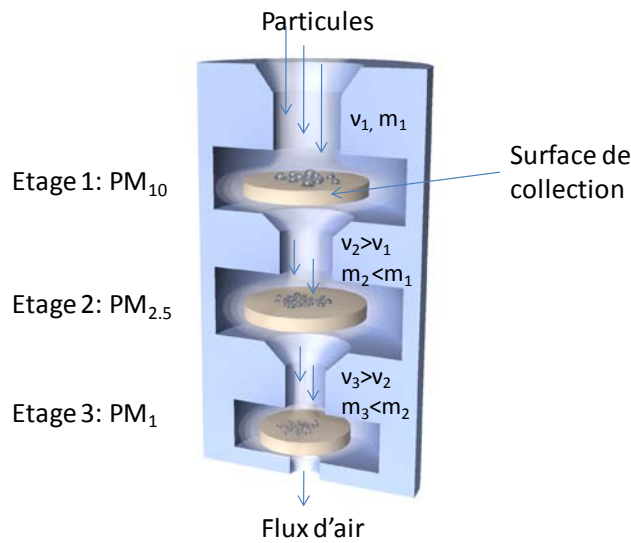


Figure 12: Principe de l'impacteur inertiel en cascade

Le support dévie l'écoulement curvilinéaire d'un angle de 90° , ainsi, les particules de masse m_1 qui ont une inertie suffisante ne peuvent pas suivre les lignes de courant de l'écoulement et s'impactent sur le support (étage 1) à la vitesse v_1 . Les plus petites particules de masse $m_2 < m_1$, n'ayant pas une inertie suffisante, poursuivent leur trajectoire dans le flux d'air et sont acheminées vers l'étage 2. Dans les étages successifs, les buses ont des diamètres de plus en plus petits, ce qui permet, à débit volumique constant, d'augmenter la vitesse de l'écoulement ($v_2 > v_1$) et l'inertie des particules.

De cette façon, on obtient un tri selon la masse des particules, équivalent à un tri volumique, ou par diamètre aérodynamique, si les particules ont des densités voisines. Chaque étage est caractérisé par un diamètre de coupure défini comme le diamètre aérodynamique correspondant à 50 % d'efficacité de collecte pour un débit donné.

Ces opérations ont été réalisées avec un appareil DEKATI (Figure 13) équipé d'un compteur volumétrique et d'une pompe permettant un débit d'aspiration de $10 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$. L'impacteur comporte trois étages avec des seuils de coupure de 10, 2.5 et $1 \mu\text{m}$.

La métrologie des particules pour la surveillance de la qualité de l'air distingue les particules « grossières » de diamètre aérodynamique moyen inférieur à $10 \mu\text{m}$ qui sont notées **PM₁₀** (PM : Particulate Matter en anglais). Les particules « fines »

désignent les particules ayant un diamètre aérodynamique moyen inférieur à $2.5\mu\text{m}$ dénommées **PM_{2.5}**. Enfin celles inférieures à $1\mu\text{m}$ sont appelées particules « ultrafines » et leur notation est **PM₁**.



Figure 13 : impacteur inertiel Dekati PM10/2.5/1

2.1.7.2 Mise en œuvre :

Un sac en PE 45×35 cm a été fixé sur l'impacteur en cascade (DEKATI). Une fois la pompe de l'impacteur en marche, 1g de particules est introduit à l'autre extrémité du sac, puis de l'air est envoyé dans le sac de façon à provoquer la mise en suspension des particules. Ces particules vont s'impacter suivant leur diamètre aérodynamique sur les différents étages recouverts d'une lame de verre qui permet par la suite de récupérer les particules (Figure 14) .

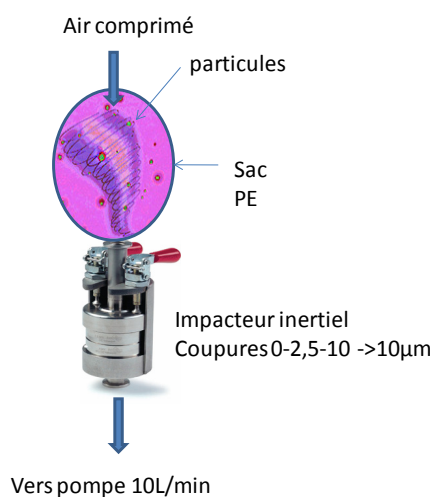


Figure 14 : mise en œuvre de la remise en suspension de particules

2.2. Caractérisation des particules

2.2.1 Démarche expérimentale

Pour étudier l'impact environnemental et toxicologique des émissions de l'usine de recyclage de plomb STCM, il est indispensable, au préalable, de les caractériser. Il est avéré que la toxicité et la biodisponibilité des particules dépend en particulier de leurs propriétés intrinsèques, telles que leur morphologie, composition, solubilité et spéciation...

Cependant, caractériser, implique tout d'abord de rendre un résultat représentatif d'un échantillon. Or, les particules générées par les activités de recyclage des batteries, présentent une forte hétérogénéité de taille après analyse granulométrique. Aussi, les analyses physico-chimiques ont été appliquées sur différentes fractions PM_{tot} , PM_{10} et $PM_{2.5}$ des particules issues des différents postes de travail, et d'émissions canalisées. L'objectif était de mettre en évidence, les éventuelles différences de caractéristiques physico-chimiques en relation avec la fraction granulométrique.

Diverses techniques de caractérisation physico-chimiques ont été utilisées de façon complémentaire afin d'obtenir des informations :

- à diverses échelles de taille,
- en fonction des limites de détection
- de composition moyenne ou ponctuellement pour détecter des phases minoritaires qui par leur forte réactivité peuvent tout de même jouer un rôle majeur en terme de transfert ou toxicité.

L'ensemble des techniques de caractérisation est regroupé sous le schéma général suivant :

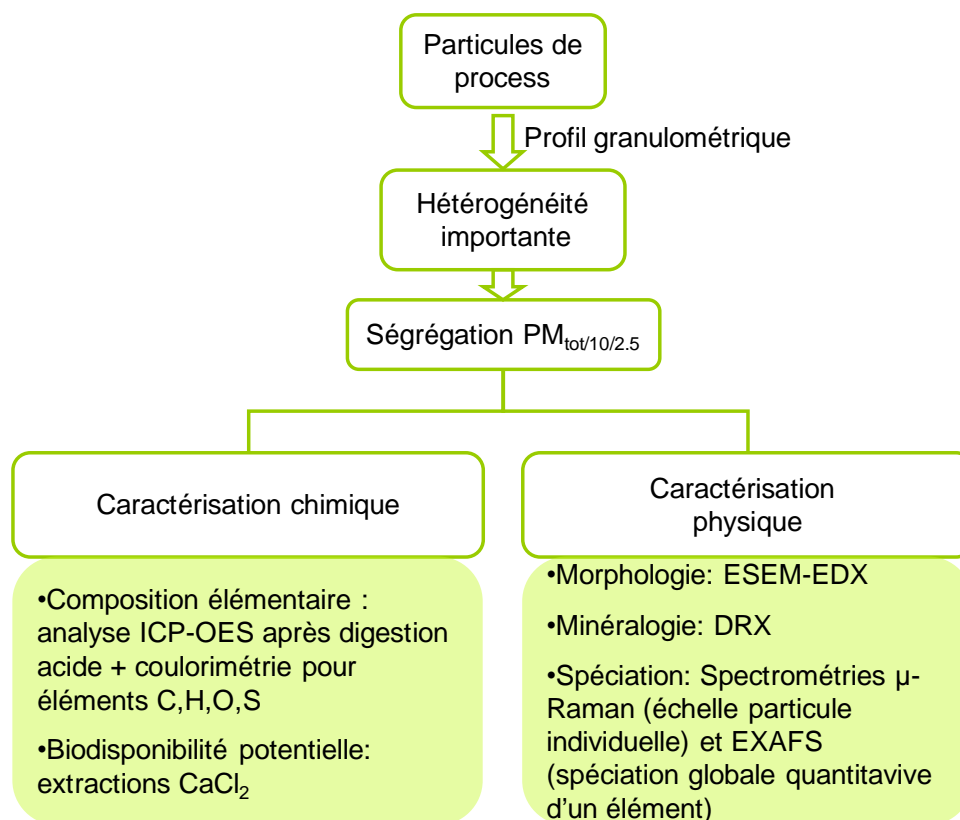


Figure 15 : stratégie de caractérisation des particules du procédé STCM

Remarque : le test d'extraction chimique au CaCl_2 permet d'estimer la biodisponibilité des métaux. On est donc, déjà dans l'étude de la réactivité. Cependant, contrairement aux études de transfert (sol-plante ou atmosphère-plante) ce test chimique est très simple, et rapide de mise en œuvre, c'est pourquoi il est associé à la partie caractérisation des particules.

Il est indispensable de coupler ces méthodes physiques et chimiques, car elles n'apportent pas toutes le même niveau d'information : de la composition globale jusqu' au niveau de la particule élémentaire. De plus, les techniques ont des seuils de détections différents. Ci-dessous, sont récapitulés les « points forts » et les limites de chaque technique d'analyse utilisée :

- ICP-OES : détermine la composition élémentaire des particules pour les éléments métalliques, mais ne donne pas d'indication de spéciation. Les éléments légers comme l'hydrogène ou les éléments difficiles à mettre en solution comme le carbone, l'oxygène, le soufre ne sont pas analysables par ICP-OES. Ils ont été dosés après combustion par un analyseur élémentaire avec détection coulométrique-catharométrique et infra-rouge.

- DRX : identifie les spéciations majoritaires mais ne détecte pas les phases minéralogiques mineures (<1% en masse), ni les phases amorphes.
- MEB-EDS : apporte des informations sur la taille, la morphologie, une indication sur la composition élémentaire locale (limite de détection, 1% atomique) mais ne renseigne pas sur la spéciation de l'élément..
- Microspectrométrie Raman (μ Raman) : donne la spéciation à l'échelle de la particule individuelle, mais difficilement quantitatif.
- EXAFS : spéciation atomique moyenne de l'échantillon pour un élément cible déterminé.
- Extractions CaCl_2 : indication de la solubilité des particules dans ce sel, qui est présent dans les solutions de sol. Selon de nombreux auteurs, ce test permettrait d'estimer la fraction biodisponible des métaux d'un sol.

D'où l'intérêt de coupler ces techniques pour être le plus exhaustif possible.

2.2.2 Techniques chimiques

2.2.2.1 Mesures des concentrations élémentaires

Les concentrations élémentaires ont été déterminées par ICP-OES (IRIS Intrepid II XDL ICP-OES) après digestion acide suivant le protocole suivant :

- - Prise essai : 0.1 g de particules dans un réacteur téflon.
- - Ajout de 2 mL HNO_3 + 0.2 mL HF.
- - Plaque chauffante 96h à 100 °C système fermé.
- - Ajout de 0.5 ml HCl.
- - Plaque chauffante 48h à 100 °C système fermé.
- - Ajout de 0.5 ml HCl.
- - Plaque chauffante 48h à 100 °C système fermé.
- - Reprise et dilution avec eau UHQ avec un facteur de 100 000 avant dosage.

Les mesures ont été validées par des blancs et avec un matériau de référence, l'ion 915, lot 600 délivré par le National Bureau of Standard.

Analyte	Valeur certifiée (mg.L ⁻¹)	Valeur observée
Chlore	1.39 ± 0.284	1.40 ± 0.2
Mg	2.8 ± 0.28	2.82 ± 0.15
K	0.49 ± 0.08	0.50 ± 0.08
Na	1.35 ± 0.196	1.36 ± 0.16
Si	1.16 ± 0.095	1.16 ± 0.08

Les éléments légers comme C, H; O, S difficilement solubilisables ne sont pas dosables par l'ICP car ils interfèrent avec l'air ambiant. Aussi, le dosage de ces éléments a été réalisé après combustion, par un analyseur élémentaire avec détection coulométrique-catharométrique et infrarouge.

2.2.2.2 Estimation de la fraction potentiellement biodisponible des particules.

2.2.2.2.1 Choix du protocole

La connaissance de la concentration totale d'un métal est insuffisante pour estimer les risques liés à sa présence dans l'environnement (Dumat et al., 2001 ; Lamy et al., 1999). Ces risques seront, en effet aussi fonction de sa compartimentation, de sa spéciation, de la taille des phases porteuses, etc., car tous ces facteurs influencent en particulier fortement la capacité de transfert phase solide-solution d'un métal et donc sa réactivité. Comme l'étude de réactivité en aval, porte principalement sur les végétaux, nous nous sommes intéressés à la partie échangeable de l'élément, c'est-à-dire la fraction potentiellement phytodisponible.

En effet, dans la suite de la thèse, des sols témoins ont été contaminés avec ces particules caractérisées avant d'y exposer des plantes potagères. Ainsi, en connaissant la fraction échangeable intrinsèque de ces particules, nous pourrions ensuite la comparer à la fraction échangeable du sol contaminé avec ces mêmes particules et aux teneurs dans les végétaux.

Le protocole d'extraction de la partie échangeable des particules directement collectées dans l'usine STCM Toulouse, a été choisi en se basant sur les résultats des différentes méthodes existantes. Selon Menzies et al. (2007), les extractions aux sels neutres donnent la meilleure indication en terme de phytodisponibilité.

Parmi ces dernières, le protocole au CaCl_2 10^{-2} M est considéré comme le mieux adapté à divers types de métaux (Meers et al. 2007), ce qui est le cas pour cette étude qui concerne des poussières multi-élémentaires. De plus ce type d'extractant a fait l'objet d'une normalisation aux Pays-Bas (NEN 5704) selon le protocole de Houba et al. (1996) pour les sols. Ce protocole a été adapté aux particules de process, en se référant à d'autres extractions sur ce type de support. Ci-après est présenté un tableau comparatif d'extractions sur sol et particules, utilisé pour élaborer le protocole final :

Type échantillon	extractant	concentration	temps contact agitation	Rapport s/l	Prise essai	Séparation liquide/solide	température	références
Poussières <600 μm	MgCl ₂	1 mol.L-1	1H	1/8	1g	Centrifugation 3000 rev /min pdt 15 min	20°C, pH 7	Al-Chalabi et al. 1996
Particules en suspension Sol tamisé à 2 mm	MgCl ₂	1 mol.L-1	2 H	Non renseigné	Non renseigné	Filtration 0.22 μm	20°C, pH 7	Al-Masri et al. 2005
	CaCl ₂	10-2 mol.L-1	2H	1/10	5g	Centrifugation 3000g/10 min		Houba et al., 1997
Sol	CaCl ₂	10-2 mol.L-1	2 H	1/10	2g	Non renseigné	20°C	Gupta, 2005
Sol	CaCl ₂	10-2 mol.L-1	2H	1/10	5g	Centrifugation 1300 g / 10 min + filtration à 0.22 μm	20±2°C	Muller et al., 2002
Sol	CaCl ₂	10-2 mol.L-1	30 min	1/ 2.5	10g	Filtration à 2.5 μm	90°C	Mcbride,2003
Sol	CaCl ₂	10-2 mol.L-1	2H	1/10	2.5g	Non renseigné	Non renseigné	INRA Arras selon norme Pays-Bas(NEN 5704)
Sol	CaCl ₂	10-2 mol.L-1	2H	1/10	10g	Centrifugation 3000g / 10 min	Non renseigné	Pueyo et al., 2003

Tableau 1 : comparaison de protocoles d'extractions aux sels neutres

2.2.2.2.2 Protocole

Echantillon : poussières sédimentables chargées en métaux

1g de poussières (la fraction <2 mm obtenue par tamisage sur tamis inox Afnor) + 10 ml de solution de CaCl_2 à 0.01M ($\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 99.995 Suprapur Merck) placés dans un tube de centrifugation en polypropylène de 50 ml sous agitation continue à 50 oscillations/min pendant 2h (table agitation, Heidolph promax 1020), 20°C.

Le rapport solide/liquide (1 : 10) a été choisi selon Houba et al. (1996). Ce rapport est à priori suffisamment élevé pour limiter les effets liés à l'hétérogénéité de l'échantillon, et permettre un échange suffisant, pour obtenir une concentration en

métal détectable par ICP-AES. Après les 2 heures d'agitation, le tube est centrifugé : 10 000 g pendant 30 min (Avanti 30 centrifuge Beckman).

Le surnageant est prélevé, filtré à 0.22 μm (filtre seringue Millex en acétate de cellulose), acidifié à 2% avec HNO_3 bidistillé (15N, suprapur 99.99%) et réservé à 4°C.

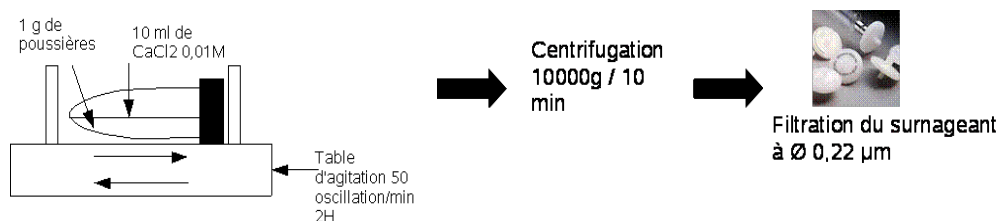


Figure 16 : Protocole d'extraction CaCl_2

Les analyses de concentrations ont été réalisées par ICP-OES (IRIS Intrepid II XDL/ Thermo Electron Corporation).

Standards utilisés lors des analyses ICP :

ICP/OES : gamme étalon couplée à un standard de référence ion 915.

2.2.3 Techniques physiques

2.2.3.1 La granulométrie laser

Les profils granulométriques des particules ont été réalisés par granulométrie laser. Le principe de la mesure de la taille des particules par granulométrie laser est basé sur la diffraction de la lumière lorsqu'une particule est illuminée par une source lumineuse (rayon laser). Chaque particule présente devant le faisceau va générer une quantité de lumière déviée dont l'intensité sera proportionnelle à sa taille. Ainsi, lorsque le faisceau laser éclaire une particule, on peut observer des franges de diffraction. L'intensité du rayonnement diffracté et l'angle de diffraction dépendent de la taille des particules (plus la particule est petite, plus l'angle de diffraction est grand) : c'est ainsi qu'est obtenue « la tache d'Airy » (figure de diffraction, représentant un disque central, et des cercles concentriques de plus en plus atténués). La largeur de la tache d'Airy, permettra par la suite de déterminer la taille des grains (théorie de diffraction de Fraunhofer). On considère que l'approximation

de Fraunhofer reste vraie lorsque les particules sont sphériques non poreuses et non opaques, que ces particules ont un diamètre supérieur à la longueur d'onde et que les particules sont animées d'un mouvement aléatoire. Dans le cas des matériaux dont les indices n_s sont compris entre 1,5 et 1,7, en suspension dans l'eau, la limite de validité de l'approximation de Fraunhofer, est atteinte pour des particules de diamètre compris entre 1 et 10 μm . Dès lors, l'emploi du modèle de Mie se justifie lorsque l'on désire caractériser la distribution de taille d'un matériau constitué de particules microniques. Ce modèle, plus complet, prend en considération l'ensemble des phénomènes optiques liés à la diffusion des particules (diffraction, réfraction, réflexion). Le calcul de l'image de diffusion dépendra dans ce cas non seulement de la distribution granulométrique théorique considérée, mais également de la nature du matériau diffusant, par l'intermédiaire de ses propriétés optiques :

$$m = n - ik \quad (1)$$

Avec m l'indice de réfraction complexe

n la partie réelle de l'indice de réfraction

k la partie complexe de l'indice de réfraction, appelée indice d'absorption

La réponse de l'appareil est donc une distribution granulométrique : l'axe des abscisses, gradué en microns correspond au diamètre des particules (échelle logarithmique) et l'ordonnée, représente le pourcentage volumique de chaque classe granulométrique, c'est-à-dire la répartition des sphères équivalentes qui pour le même volume occupé que par l'échantillon mesuré, conduit au même spectre. Les résultats sont fournis de façon numérique et graphique, donnant à la fois l'histogramme de répartition des classes, et la courbe du cumulé. Dans notre travail nous avons utilisé le granulomètre laser Mastersizer Micro 2000 (Malvern Instrument). Ce granulomètre laser conçu pour l'étude des poudres, des émulsions et des suspensions de tailles comprises entre 0.02 μm et 2000 μm .

La gamme de détection de utilisée pour notre étude se situe entre 0.02 μm et 300 μm : ce choix est adapté à notre étude car les particules sont fines : au dessus de 300 μm le % volumétrique résiduel < 0.1%.

L'appareil se compose d'une source de lumière qui est composée de deux faisceaux laser émettant dans le rouge (laser He-Ne $\lambda = 633 \text{ nm}$) et le bleu (laser solide $\lambda = ??? \text{ nm}$), d'une cellule échantillon de volume $v = \text{XXX cm}^3$ et de détecteurs permettant de mesurer l'intensité diffractée ou diffusée.

Préparation des échantillons :

Les particules sont tamisées à 2 mm de façon à éliminer quelques pépites de plomb présentes.

Les poussières ont été suspendues dans une solution d'éthanol à 99 %, afin d'éviter la dissolution éventuelle des phases solubles.

Les poudres en suspension sont dispersées par ultrasons pendant 10min.

2.2.3.2 La diffraction des rayons X

La diffraction des rayons X sur poudre permet de déterminer en premier lieu les espèces cristallisées de façon qualitative et dans certains cas quantitatives.

Cette méthode de routine, facile à mettre en œuvre ne s'applique qu'à des systèmes à l'état cristallin (arrangement périodique, ordonné et dans des plans réticulaires tridimensionnels des atomes constitutifs). Les atomes s'organisent donc en plans réticulaires (d), plus ou moins denses, qui sont désignés par leurs indices de miller (h , k , l). Avec un rayonnement de longueur d'onde suffisamment petit, on peut obtenir des diffractions par les plans réticulaires (de la même manière que les rayons lumineux sont diffractés par les petites fentes d'un réseau en optique). La diffraction est d'autant plus intense que le plan est « dense » c'est-à-dire riche en atomes. Les phases amorphes ne sont pas détectées.

Le principe réside sur la loi de Bragg :

Si λ est la longueur d'onde de la radiation et d est la distance interréticulaire du plan cristallin diffractant, alors les directions 2θ de l'espace dans lesquelles on aura des pics d'intensité (le 0 pour 2θ étant la direction du faisceau incident) vérifient :

$$2d \sin \theta = n \cdot \lambda$$

- avec :
- d = distance interréticulaire, c'est-à-dire distance entre deux plans cristallographiques ;
- θ , angle de Bragg = demi-angle de déviation (moitié de l'angle entre le faisceau incident et la direction du détecteur) ;
- n = ordre de diffraction (nombre entier) ;
- λ = longueur d'onde des rayons X.

L'analyse qualitative des phases majoritaires (>1% massiques) cristallines a été réalisée par un diffractomètre de marque INEL, équipé d'un compteur courbe CPS 120, permettant un domaine angulaire de détection de 120° et fonctionnant avec une anticathode de cobalt ($K_{\alpha,Co} = 0,202 \text{ nm}$).

Préparation des échantillons : Les échantillons de particules sont broyées dans un mortier en agathe, puis mises en forme à l'aide d'une pastilleuse. .

2.2.3.3 La microscopie électronique à balayage analytique

La microscopie électronique pour les particules et les végétaux, a été réalisée avec un MEB environnemental Quanta 200 (FEI) couplé à l'analyse chimique EDX (Quantec Rontec) de l'UMR 8110 PBDS localisé à Lille.

Cet appareil permet d'obtenir une image (due à l'interaction entre les électrons du faisceau laser, et ceux de la matière), assortie d'une analyse élémentaire quantitative, (grâce à un récepteur de rayons X à dispersion d'énergie). La résolution spatiale en mode imagerie (électrons secondaires et électrons rétrodiffusés) est inférieure à $0.3 \mu\text{m}$, et les limites de détection pour l'analyse chimique sont environ à 1% massique.

Contrairement aux MEB conventionnels, qui nécessitent un vide poussé à tous les niveaux de la colonne, l'ESEM fonctionne avec une pression pouvant atteindre 50 Torr (mode low vacuum ou environnemental). Ceci permet de passer des échantillons de végétaux secs, non enrésinés.

Pour nos échantillons nous avons travaillé à 25 keV à des grossissements allant de 40 à 4000.

Préparation des échantillons : Les particules sont déposées sur un scotch carbone, posé sur un plot porte échantillon en aluminium. Les végétaux secs collés sur le support avec un scotch carbone.

2.2.3.4 La microspectrométrie Raman

La spectrométrie Raman exploite le phénomène de la diffusion inélastique d'un photon par la matière. Cette inélasticité implique un échange d'énergie entre le

photon incident, et la molécule, via la création ou l'annihilation d'un phonon optique (vibrations collectives d'un ensemble d'atomes en interactions dans un solide cristallin, c'est-à-dire un « paquet élémentaire de vibration ou de son »). S'il n'y a pas d'échange d'énergie entre la molécule et le photon incident ($h\nu = h\nu_0$), alors, la diffusion est élastique, et la longueur d'onde du photon diffusé n'est pas décalée. On parle de diffusion Rayleigh (Figure 17) Si la lumière diffusée n'a pas la même longueur d'onde que la lumière incidente, on distingue deux cas décrits sur la Figure 17 :

(1) Décalage Stokes : la lumière est décalée vers le rouge (plus longue longueur d'onde → plus faible énergie) avec la création d'un phonon et donc d'une raie Raman ($h\nu_\sigma = h(\nu_0 - \nu)$).

(2) Décalage anti-Stokes : la lumière est décalée vers le bleu (plus courte longueur d'onde → plus grande énergie) avec l'absorption d'un phonon ($h\nu_{\sigma} = h(\nu_0 + \nu)$).

L'opérateur d'interaction entre une molécule et une radiation électromagnétique, représentée par le champ électrique \vec{E} , est de la forme $H' = -\vec{p} \cdot \vec{E}$, où \vec{p} est le vecteur moment dipolaire de total de la molécule.

\vec{p} peut être mis sous la forme : $\vec{p} = \vec{\mu} + \alpha \vec{E}$, $\vec{\mu}$ est le moment dipolaire intrinsèque et α le tenseur de polarisabilité de rang 2.

Le passage de la molécule d'un état vibrationnel initial, défini par le nombre quantique ν , à un état vibrationnel final défini par ν' est observable en diffusion Raman si le tenseur de polarisabilité possède au moins un élément non nul ($\frac{\partial \alpha}{\partial t} \neq 0$). Les

intensités Raman des différentes transitions dépendent essentiellement des propriétés intrinsèques des composés et sont proportionnelles à $\left| \frac{\partial \alpha}{\partial t} \right|^2$.

L'intensité des raies Raman, dépend seulement du nombre de molécules dans les différents états vibrationnels qui leur sont associés, et non de la longueur d'onde d'excitation. Expérimentalement, on obtient un spectre de diffusion Raman dont les positions des bandes, et leur rapport d'intensité représentent la « carte d'identité » du produit analysé. Ceci permet d'obtenir les empreintes moléculaires des espèces qui composent un échantillon (la spéciation chimique). Les espèces moléculaires sont identifiées en comparant les spectres expérimentaux (nombres d'ondes des bandes et intensités relatives) aux spectres des banques de spectres Raman des bibliothèques de

spectres Raman à l'aide du logiciel Spectral Search ID 301 (Thermo galactic). Le HQI (hit quality index) représente le degré de similitude entre le spectre inconnu et celui de la base de données.

Liste des banques de données

Jobin-Yvon Horiba,

Mineral Spectroscopy Server California Institute of Technology, Pasadena, California, USA (http://minerals.gps.caltech.edu/files/raman/Caltech_data/index.htm)

Server of Physics, Department of the University of Parma Italy
<http://www.fis.unipr.it/~bersani/raman/raman/spettri.htm>

http://www.aist.go.jp/RIODB/rasmin/E_index.htm

<http://www.chem.ucl.ac.uk/resources/raman/index.html>

La focalisation du faisceau laser, par un objectif de microscope à la surface de l'échantillon, permet l'analyse d'un volume d'environ $1\ \mu\text{m}^3$ dans le cas idéal de solides homogènes, isotropes et transparents (Brémard et al., 1985) ; ce qui n'est pas le cas des particules de process ou des sols par exemple.

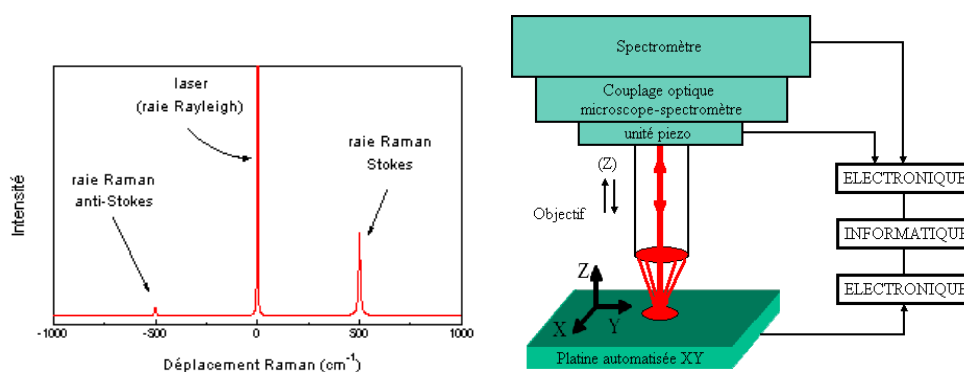


Figure 17 : Spectre Raman et schéma de principe de la microspectrométrie Raman confocale

Toutes les données concernant la caractérisation des particules ont été enregistrées sur un microspectromètre Raman confocal de Jobin Yvon S.A (LabRAM) (Horiba Group) équipé d'un détecteur CCD (2044x512 pixels). La diffusion Raman est obtenue après une excitation dans le visible à 632,8 nm. Le laser est focalisé à la surface de l'échantillon par un objectif x100 grande frontale (Olympus BX 40- N.A 0,80). Les images Raman ont été réalisées grâce à une platine automatisée en XY

permettant une analyse point par point avec un pas de 1 μ m. Cette platine permet de réaliser des déplacements en XY de 90 x 60 mm.

Les conditions expérimentales utilisées, ont été optimisées pour l'ensemble des analyses. Les spectres ont été enregistrés avec une ouverture du trou confocal de diamètre 500 μ m et de la fente spectrale de 150 μ m. Les mesures ont été réalisées en mode autofocus (auto focalisation en Z du faisceau laser à la surface de l'échantillon par un dispositif utilisant un cristal piézoélectrique), le temps d'acquisition du spectre mesuré entre chaque pixel était de 30 secondes.

Dans le cas de l'analyse de surfaces des feuilles, l'utilisation de la radiation visible (400 nm $<\lambda <$ 800 nm) pour exciter la diffusion Raman n'est plus valable. En effet, sous l'effet de la radiation dans le visible les espèces organiques constituant la feuille (la chlorophylle par exemple) émettent un signal de fluorescence très intense qui masque le signal de diffusion Raman. L'utilisation de l'UV comme sonde Raman permet de s'affranchir de ces effets souvent situés bien au-delà de ce domaine spectral. Par ailleurs l'intensité diffusée variant env 4, le signal Raman est intensifié quand on l'excite dans le domaine de l'UV. Enfin, les rayonnements UV ont une longueur de pénétration faible dans la plupart des matériaux (de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres), ce qui permet de réduire considérablement la profondeur du matériau sondée et donc de confiner les informations obtenues à des phénomènes de surface. L'appareil utilisé est un Labram HR UV 800 (Jobin Yvon, Horiba Gr, France) utilisant un laser solide MBD 266 system (Coherent – laser group) à 266 nm, un objectif UV Mitutoyo X80, 0.55 NA) et équipé également d'une platine automatisée en XYZ.

Le balayage d'une zone de dimension connue (X,Y), choisie par l'opérateur, permet d'enregistrer un nombre de spectres dont le nombre sera égal à XxY pixels qui déterminera notre image. Cette procédure de balayage automatisé de la surface de l'échantillon permet d'obtenir une analyse plus représentative des échantillons. A chaque pixel correspond un spectre, également appelé spectre de pixel, l'image est alors constituée des XxY spectres de pixels (Figure 18). Un spectre de pixel correspond au spectre Raman d'un composé pur ou bien d'un mélange de composés purs, mais encore être un spectre de luminescence.

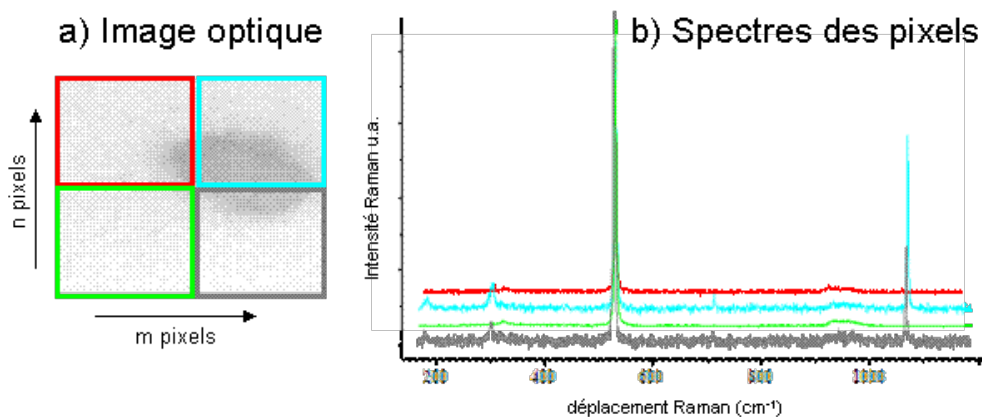


Figure 18 : a) image optique divisée en (2x2) pixels ; b) spectres des pixels correspondants à la zone analysée contenant (2x2) spectres Raman.

Préparation des échantillons : Les échantillons (particules ou feuilles) sont disposés sur une lame de verre (ou de silice pure) propre directement sous l'objectif du microscope sans autre préparation.

2.2.3.5 EXAFS

L'EXAFS (Extended X-Ray Absorption Fine Structure) est une technique d'absorption des rayons X qui utilise le rayonnement synchrotron. Ce rayonnement est une lumière émise par des électrons relativistes (quasiment à la vitesse de la lumière) de très haute énergie (l'énergie nominale du synchrotron SOLEIL est de 2,75 GeV) qui tournent dans un anneau de stockage de 354 m de circonférence. Ce rayonnement est d'une grande brillance, 10000 fois plus intense que la lumière solaire, de grande gamme spectrale, source blanche allant des infrarouges (1eV) au rayons X durs (50KeV), et polarisé (linéairement, circulaire). Quand le rayonnement X, correspond à l'énergie de transition d'un électron depuis un niveau du cœur (K,L1..) de l'atome vers un niveau du continuum, on observe un seuil d'absorption (seuil K, seuil L1..), l'électron est éjecté. L'énergie associée est sélective de l'espèce atomique, et l'électron est alors diffusé par l'environnement de l'atome absorbeur.

L'électron éjecté, s'il est diffusé par les atomes voisins (ce qui dépendra de son énergie), pourra « revenir » à son atome de départ et donc interférer avec lui-même. On parle de diffusion multiple, si l'électron est diffusé par plusieurs atomes, et de diffusion simple s'il est diffusé par un atome unique (il fait un aller-retour). Comme l'énergie de l'électron éjecté dépend de l'énergie du faisceau de rayonnement X, on observe des oscillations dans le spectre de l'absorption en fonction de l'énergie (oscillations de Kronig).

Quand l'énergie est à peine supérieure au seuil, les diffusions multiples sont dominantes. L'analyse de cette partie du spectre se nomme le XANES. À des énergies plus élevées, la diffusion simple devient dominante, l'analyse du spectre donne des informations sur les distances interatomiques, c'est le domaine de l'EXAFS, technique que nous avons utilisée dans cette étude.

2.2.3.5.1 Extraction des spectres EXAFS

La fonction d'interférence EXAFS $\chi(k)$ a été extraite avec le programme ATHENA version 9, qui fait partie du package IFEFFIT (Ravel & Newville 2005). Le spectre pour les particules a été coupé à 10 \AA^{-1} à cause de l'interférence avec la bande K, 13474 eV du brome.

2.2.3.5.2 Combinaisons linéaires

Les spéciations chimiques des échantillons ont été simulées par combinaisons linéaires de spectres de références, en utilisant la méthode des moindres carrés.

L'objectif de cette méthode, est d'estimer rapidement l'environnement atomique de l'atome cible dans l'échantillon. L'incertitude des résultats par cette méthode est de 10%, mais étant donné que nos spectres étaient coupés à 10 \AA^{-1} , la simulation numérique, plus longue à mettre en œuvre, n'aurait pas donné de meilleurs résultats.

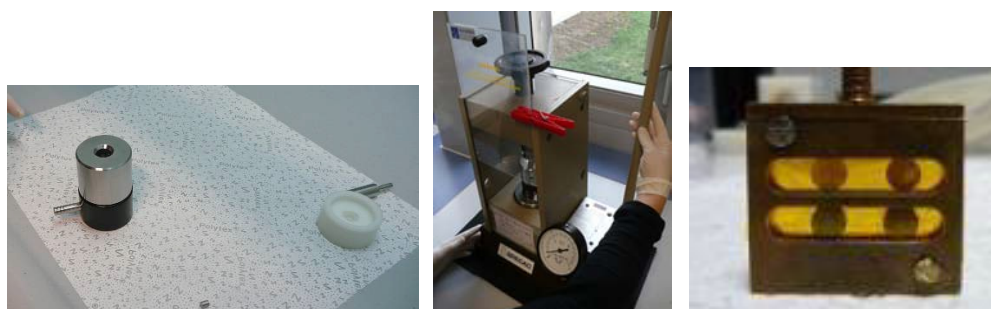
Les composés standards du plomb utilisés ont été choisis d'après la littérature concernant la spéciation du plomb : (i) dans les particules de process des entreprises de recyclage de batteries (Sophie Sobanska et al. 1999) et (ii) dans les végétaux (Sarret et al. 1998). Ces composés de référence incluaient :

- des composés inorganiques : PbS, PbSO₄, PbO·PbSO₄, α -PbO, β -PbO, PbCO₃, Pb(OH)₂CO₃, Pb-FeOOH (composé donné par A. Scheinost, (Scheinost et al. 2001))
- des composés organiques (surtout utilisés pour les végétaux) : Pb complexé par des acides organiques : Pb-acetate, Pb-oxalate, Pb-citrate, Pb-naphtoate, Pb-benzoate, Pb-tartrate, Pb-catechol, Pb-acide humique, Pb complexé par des thiols: Pb-cysteine, Pb-glutathion.

Un composant était ajouté dans la combinaison linéaire lorsque la qualité du fit était améliorée significativement, c'est-à-dire si le résidu de la somme des carrés

normalisée ($NSS = \frac{\sum [k^3 \chi_{exp} - k^3 \chi_{fit}]^2}{\sum [k^3 \chi_{exp}]^2} * 100$) diminuait de 10%. Les combinaisons satisfaisantes ont été définies par augmentation de 5% du NSS par rapport à celui du meilleur fit. Les pourcentages, pour chaque spéciation présentée dans cette étude, sont la moyenne des combinaisons linéaires répondant au critère précédent.

2.2.3.5.3 Préparation des échantillons :



Particules : Réalisation de pastilles de particules diluées dans du nitrure de bore pour avoir moins de 10% de plomb dans l'échantillon. Pastilles de 5 mm de diamètre par 2 mm d'épaisseur, de surface plane.

Composés de références : Pour les poudres (composés inorganiques), préparation identique aux particules ci-dessus.

Liquides : préparation des solutions Pb-organique juste avant le passage, afin de prévenir l'oxydation (+ rajout d'acide ascorbique pour Pb-glutathion très sensible à l'oxydation). Puis congélation de ces liquides avec 30% de glycérol (permet au mélange de rester amorphe pendant la congélation afin d'éviter la perturbation du faisceau qui passe d'un grain à un autre en cas de cristallisation).



2.2.3.5.4 Conditions opératoires :

Les spectres ont été enregistrés au synchrotron SOLEIL (St Aubin, France) sur la ligne de lumière SAMBA équipée d'un double cristal monochromateur Si(111), au seuil LIII du plomb (13.05 KeV) en focalisation sagittale.

Les spectres des particules, et des composés de références inorganiques (PbS, PbSO₄, PbO.PbSO₄, α-PbO, β-PbO, PbCO₃, Pb(OH)₂CO₃) ont été enregistrés à température ambiante. Les composés organiques, qui ont surtout servis pour les végétaux (voir section transfert atmosphère- plante) ont été enregistrés à 77K sous azote, afin d'éviter des changements de spéciation pendant l'acquisition.

2.3. Transfert du plomb des particules vers les végétaux

2.3.1 Généralités

2.3.1.1 La laitue : *Lactuca sativa*

Une des principales questions scientifiques de cette étude, consistait à étudier le transfert atmosphérique des métaux. Dans ce but, un légume feuille avec une large surface d'interception était recherché. Parmi les légumes recensés cultivés en France, se trouvaient le chou, les épinards, les blettes et la salade. La laitue de type batavia (*Lactuca sativa* var « *Capitata* »), plante annuelle originaire d'Asie, appartenant au genre *Lactuca* de la famille des Astéracées a été choisie, car elle est largement cultivée en maraîchage et dans les jardins potagers. Elle a en conséquence déjà fait l'objet de plusieurs études de transfert de métal (Waisberg et al., 2004; Alexander et al., 2006 ;Khan et al., 2008). La laitue est également utilisée comme plante modèle pour les ICPE (installations classées pour l'environnement) astreintes par la DRIRE à réaliser des contrôles de concentrations sur les végétaux autoproduits, autour de leur entreprise.

Le cultivar « Batavia Blonde dorée de Grenoble », a été utilisé pour cette étude.

2.3.1.2 Conditions de culture

Les graines sont désinfectées dans une solution à 0.9% CaClO pendant 15 minutes et rincées à l'eau déionisée. Après trois jours de germination à l'obscurité, les jeunes

plantules de laitue sont cultivées en hydroponie dans une solution nutritive pendant 10 jours.

Cette mise en place nécessite le passage des racines au travers de la grille en polyamide, et pour que les dispositifs flottent librement à la surface d'une solution nutritive de Hoagland aérée (cf. (Uzu et al., 2009) pour la composition), une plaque en polystyrène est percée d'orifices, en fonction du diamètre du second cylindre utilisé (PVC ($\varnothing = 33$ mm)). Le niveau de solution est maintenu de telle manière qu'il affleure la toile à bluter. Les expériences ont été menées en phytotron avec des conditions de lumière, de température et d'humidité contrôlées. Pendant deux semaines, les plantules se développent et la grille se recouvre de racines.

Après 10 jours de croissance, ces laitues ont fait l'objet de deux types d'expérimentation qui sont développées dans les sous-chapitres suivants :

-Transfert sol-plante : exposition de ces plantules à des sols contaminés avec différentes tailles de particules.

-Transfert des plantules en pot (sol non contaminé) et exposition aux retombées de particules atmosphériques riches en Pb dans l'enceinte de l'usine, pendant 45 jours.

2.3.2 Transfert sol-plante

2.3.2.1 Principe des micro-cultures

Ce volet d'étude s'appuie sur la technique de micro-culture en hydroponie créée par Niebes *et al.* (1993) et adaptée par Guivarch *et al.* (1999) et Chaignon & Hinsinger (2003). Ce dispositif permet la croissance des plantes avec les racines en contact avec le sol mais séparé de ce dernier, permettant une analyse aisée des différents compartiments. De plus, considérant la faible quantité de sol utilisé, et le contact intime entre sol et racines au travers de la toile à bluter (porosité : $30\mu\text{m}$), le sol obtenu peut être considéré comme rhizosphérique. Ce dispositif a aussi l'avantage de requérir de faibles quantités de particules.

Ce dispositif est constitué d'une grille en polyamide (\varnothing pores = 2mm) fixée au fond d'un premier cylindre en PVC ($\varnothing = 25\text{mm}$) au moyen d'un élastique. Un second cylindre en PVC ($\varnothing = 33$ mm) est fermé au fond par de la toile à bluter en polyamide (\varnothing pores = $30\mu\text{m}$, Sefar Nytel/ Fyltis 03-30/18). Les 2 cylindres sont emboîtés, en

laissant un espace de 2 à 3mm entre les 2 cylindres afin de permettre le développement du tapis racinaire (Figure 19).

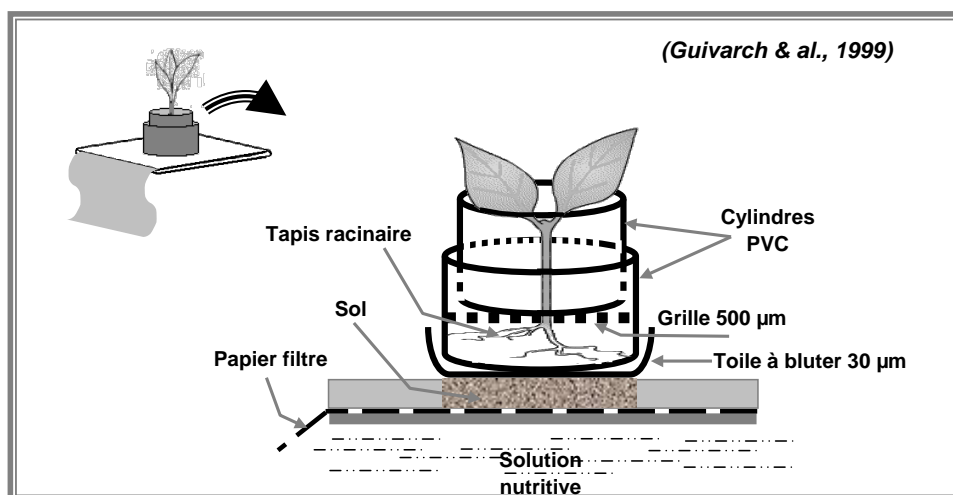


Figure 19 : Description du dispositif de micro-culture.

2.3.2.1.1 Phase de culture sur le sol

Après la phase de pré-culture (conf 2.3.1.2), des groupes de cinq répliqués de salades sont transférés, et exposés 7 jours à des sols contaminés avec des particules plombées ($1650 \pm 20 \text{ mg.kg}^{-1}$). 3 g de ces sols dopés, sont mouillés et déposés sur un papier filtre.

Trempé dans une solution nutritive, le papier filtre permet d'humidifier le sol en permanence. Le tapis racinaire est placé au contact du sol uniquement par sa face inférieure, au travers d'une toile à bluter (en polyamide) qui empêche la pénétration des racines dans le sol. Le tout est placé au dessus d'un bac contenant de la solution nutritive, aérée à l'aide de bulleurs. Pendant la croissance des plantules, le pH a été quotidiennement mesuré et le niveau de la solution nutritive a été maintenu constant. Des cylindres de sols laissés sans cultures ont été en contact avec la solution nutritive pendant les 7 jours d'exposition afin de déterminer « l'effet culture » sur le sol en comparaison avec « l'effet solution nutritive ». La Figure 20 ci-dessous résume l'ensemble des étapes de l'expérience micro-culture décrite.

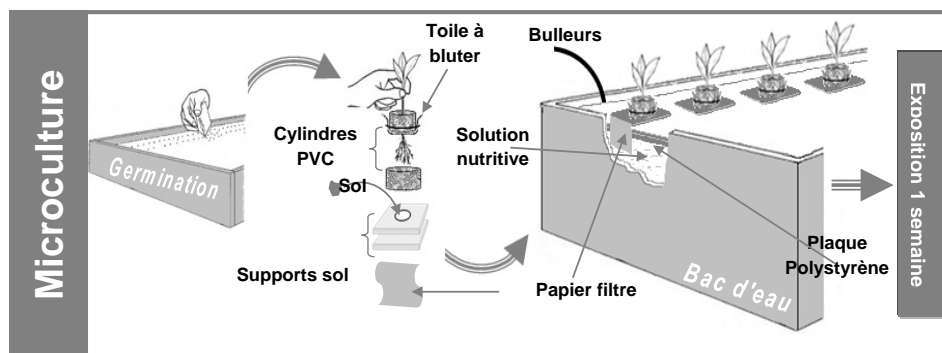


Figure 20 : Expériences Micro-culture.

2.3.2.1.2 Présentation des sols

Considéré comme un lieu privilégié d'accumulation des polluants, par ses caractéristiques physico-chimiques, le sol est susceptible d'influencer la mobilité et la biodisponibilité des éléments traces métalliques (ETM). Les ETM sont d'origine anthropique, ou issus de l'altération de la roche mère à partir de laquelle le sol s'est formé.

Leur concentration varie donc, en particulier en fonction de la profondeur et du contexte pédogéochimique (Baize, 1997). Selon Reed & Cline (1994) la composition de la solution de sol (où les racines puisent les éléments nutritifs et contaminants) dépend de plusieurs facteurs tels que la nature du métal, le pH et les caractéristiques des constituants minéraux (argiles, carbonates et oxydes de fer ou de manganèse) et organiques du sol susceptibles de fixer les ETM (Singh & Steinnes 1994).

Afin d'estimer le risque de contamination par les PM_{10} et $PM_{2.5}$ lors de leur retombée sur les sols, nous avons choisi deux sols de la région toulousaine aux caractéristiques différentes. Ces sols ont ensuite été portés à une teneur 1650 ± 20 ppm en plomb par dopage avec les PM_{10} et $PM_{2.5}$ précédemment décrites. Ils seront notés **S1** et **S2** et présentent les caractéristiques physico-chimiques suivantes avant contamination :

Sols	pH eau	CEC (cmol ⁺ /kg)	Granulométrie (g.kg ⁻¹)			C/N	MO (g.kg ⁻¹)	Calcaire total (g.kg ⁻¹)	P205 (g.kg ⁻¹) (Joret Hébert)	Eléments traces (mg.kg ⁻¹) (HF extraction)			
			Argile	Limon s	Sables					Cd	Pb	Zn	Cu
S ₁	8,3	19,9	405	261	334	9,15	18,8	36,8	0,28	0,22	35,5	101	28,5
S ₂	8,4	8,9	195	390	415	8,9	12,5	98	0,215	0,17	21	48	31

Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques des sols S1 et S2.

D'après le Tableau 2, la répartition granulométrique montre le caractère plus argileux du sol S1 et plus sableux du sol S2. Les deux sols diffèrent principalement par la capacité d'échange cationique (CEC : mesure du nombre total de sites disponibles pour l'échange de cations) qui est plus forte en S1 qu'en S2, respectivement 19.9 et 8.9 cmol+/kg. Cette différence est à priori liée aux argiles et au pourcentage en matière organique (MO) (Curtin & Rostad 1997) présentes en plus grandes quantités dans le sol S1 : 405 g.kg⁻¹ d'argile contre 195 g.kg⁻¹ pour S2 et 18,8 g.kg⁻¹ de MO pour S1 contre 12,5 g.kg⁻¹ pour S2

D'après Kabata-Pendias & Pendias (2001), les sols basiques (pH-S1= 8,3 et pH-S2= 8,4) limitent le transfert sol-plante du plomb. Cependant la taille micronique des particules et l'activité rhizosphérique devraient favoriser le passage du plomb vers la solution du sol.

2.3.2.1.3 Analyses réalisées

Après les 7 jours d'exposition aux sols contaminés (Microculture), les racines, les feuilles et les sols ont été analysés séparément. L'analyse débute par une pesée des feuilles et des racines pour déterminer leurs biomasses fraîches, qui sont transférées dans une étuve à 80°C pendant 48h afin d'évaluer leur biomasse sèche. Mais au préalable, une évaluation de la concentration en plomb adsorbée à la surface a été effectuée sur des racines fraîches grâce à une solution de HCl 10⁻² M, selon la méthode de désorption acide décrite par Ferrand et al., (2006).

Les plantes ont ensuite été réduites en fine poudre à l'aide d'un broyeur à bille, puis minéralisées à l'aide d'un appareil DigiPREP Jr SCP Sciences avec un mélange d'acide HNO₃ et d'eau oxygénée.

Par ailleurs, après avoir mesuré le pH_{eau} et pH_{KCl} des sols (avant et après culture), la fraction phytodisponible ($[\text{Pb}]$ absorbé) fut analysée grâce au protocole d'extraction CaCl_2 de Houba et al. (1996) (cf. matériel et méthodes caractérisation des particules). Les digestats des sols, des feuilles et des racines ont finalement été analysés par ICP-AES (IRIS Intrepid II XDL ICP-OES) afin de déterminer les concentrations totales en ETM. Le schéma ci-dessous résume l'ensemble des étapes de l'analyse et tous les protocoles sont détaillés en annexes.

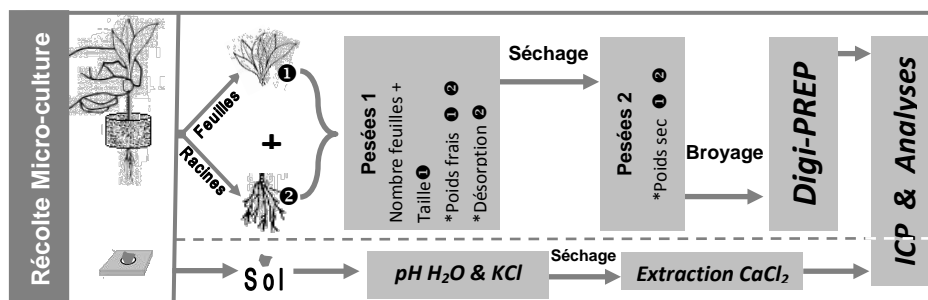


Figure 21: Résumé de la récolte micro-culture et protocoles d'analyse.

2.3.3 Transfert atmosphère-plante

Afin d'étudier le transfert des émissions atmosphériques du site de recyclage de plomb vers les parties aériennes de *Lactuca Sativa*, des plantes en pot sur sol non contaminé, ont été exposées dans la cour de l'usine pendant leur croissance.

2.3.3.1 Conditions d'exposition

Les expériences ont été réalisées dans l'enceinte de l'usine, afin d'être situées au niveau maximal des émissions diffuses. Ceci a permis d'obtenir des concentrations importantes dans les feuilles et de pouvoir dépasser les limites de détection pour les mesures de fluorescence X (50 ppm) et de spectrométrie EXAFS.

Les plantes furent mises en place à une hauteur de 1m de haut, afin d'éviter l'influence du ré-voilement des poussières du sol.

20 plantes ont été placées dans la cour de l'usine.

5 répliques ont été analysées tous les 10 jours (0-12-23-33-43) pour mesurer l'enrichissement en plomb + 5 plantes témoins laissées à l'extérieur mais en dehors

du panache des retombées du site (Ensat laboratoire, 20 km Sud) ont été analysées à la fin de l'expérience.

2.3.3.2 Analyses.

2.3.3.2.1 Mesures des concentrations élémentaires

Les teneurs en Pb, Cd, Zn, As et Sb ont été déterminées dans les parties aériennes après lavage de la ménagère (trempage dans deux eaux, puis lavage feuille par feuille) selon le même protocole de digestion acide que pour le transfert sol-plante

2.3.3.2.2 Microscopie et techniques de spectroscopie

Afin de localiser le plomb (polluant principal) dans les feuilles lavées, des cartographies ont été réalisées par spectrométrie de micro-fluorescence X, les feuilles ont été observées par microscopie électronique à balayage couplée à l'analyse chimique (ESEM-EDS) et la spéciation du plomb dans les feuilles a été déterminée et par microspectrométrie Raman (RMS).

Les principes de ces techniques d'analyses ont été décrits dans la section Caractéristiques des particules du présent chapitre, excepté pour la spectroscopie de micro-fluorescence X :

2.3.3.2.2.1 Principe de la spectrométrie de micro-fluorescence X (μ XRF : X Ray Fluorescence)

Lorsque la matière est bombardée avec des rayons X, elle a la propriété de réémettre de l'énergie notamment sous forme de rayons X ; c'est la fluorescence X, ou émission secondaire de rayons X. Le spectre des rayons X émis par la matière est caractéristique de la composition de l'échantillon. On peut en déduire la composition élémentaire de l'échantillon et la répartition des éléments dans l'échantillon.

Le spectromètre utilisé pour les mesures (EDAX Eagle III) était équipé d'une anode en Rhodium et d'un détecteur EDX mesurant la fluorescence X d'une résolution de 140 eV. Le spectromètre a été utilisé à 15 ou 20kV et de 300 à 450 μ A. Ceci a permis de recueillir cartes centimétriques de 256*200 pixels (pas de 30 à 50 μ m). Le temps de comptage a été compris entre 600 et 2000 ms par pixel. Les limites de détection de l'appareil sont estimées à 100 ppm pour le Pb et les autres métaux. Une

déconvolution des spectres a été effectuée avec le logiciel fourni par le constructeur (Vision 32 Software) puisque la raie K du soufre et la raie M du plomb se chevauchent à 140 eV. Après déconvolution, les statistiques sur le signal de fluorescence du Pb étaient meilleures pour la raie Pb-M que la raie Pb-L à plus haute tension (40 kV). Les cartographies élémentaires ont été combinées dans le mode RGB (Rouge-vert-bleu) à l'aide du logiciel Matlab™.

Cette technique nous a permis d'analyser des feuilles entières de *Lactuca sativa* et d'accéder à la répartition spatiale du plomb dans les feuilles.

2.3.3.2.2 Préparation des échantillons de végétaux :

Micro-fluorescence X, microspectrométrie Raman : les feuilles séchées ont été fixées à plat sur une lame support.

Microscopie : Métallisation à l'argent des feuilles séchées.

NB : Dans ces travaux de thèse, seuls les résultats pour le plomb sont présentés. Les autres métaux feront l'objet d'une publication ultérieure couplée avec des résultats de modélisation. En effet, l'objectif de cette expérience en conditions réelles, avait aussi pour but de renseigner avec des valeurs mesurées (expérimentales) les paramètres d'entrées d'un modèle multimédia. Ce modèle développé à l'INERIS (R.Bonnard) prévoit les concentrations en polluant dans les végétaux à partir des données environnementales comme le taux de plomb dans l'air, les quantités de retombées, l'indice de précipitation. Aussi de nombreuses mesures complémentaires ont été effectuées autour des cultures.

2.4. Transfert du plomb des particules vers l'Homme

2.4.1 Inhalation

L'**inhalation** est une voie majeure d'absorption du plomb en milieu professionnel. Il existe trois façons de tester le potentiel toxique de PM par inhalation : les tests cellulaires in-vitro, in-vivo, et les tests chimiques (acellulaires). Dans ces travaux, nous avons procédé de manière in-vitro et acellulaire.

2.4.1.1 Essais in-vitro : cytotoxicité et réponse inflammatoire

Ces tests in-vitro ont été réalisés au laboratoire des Réponses Moléculaires et Cellulaires aux Xénobiotiques, dans l'unité de biologie fonctionnelle et adaptative,

(BFA), EAC CNRS 7059, Université Paris Diderot-Paris7, sous la responsabilité d'Armelle Baeza-Squiban (MDC, HdR toxicologie/environnement/santé), avec la doctorante Stéphanie Val (thèse : « Cellular and molecular mechanisms induced by urban and rural aerosols on airway epithelial cells »).

2.4.1.1.1 Cellules et conditions de cultures.

Des cellules épithéliales bronchiques humaines de lignée 16HBE14o- (offertes par le Dr. Gruenert, NIH, Los Angeles, California University, USA) ont été cultivées dans du milieu de culture DMEM/F12 supplémenté avec :

- Des antibiotiques pour éviter toute contamination bactérienne : pénicilline (100 µg.mL⁻¹) et streptomycine (100 µg.mL⁻¹).
- Un antifongique : fungizone (1 µg.mL⁻¹).
- De la glutamine (0.292 µg.mL⁻¹), acide aminé essentiel pour les protéines. Déjà présent dans le milieu, cet acide aminé se désamine spontanément à 37°C. Il est ajouté pour être présent à 1%.
- Des facteurs de croissance cellulaires : Ultrosor G (UG) 2% (Biosepra; Cergy Pontoise, France) qui se substitue au sérum de veau fœtal (qui comporte trop de variabilité dans la composition et un risque de contamination par prion). L'UG apporte de l'albumine, de la transférine (action sur l'activité mitotique) et des hormones stéroïdes (œstrogènes) impliquées dans la division cellulaire.

Les cellules ont été cultivées dans des boîtes de culture plastiques (Costar, VWR; Fontenay-Sous-Bois France), après avoir été recouvertes avec du collagène de type I à 4 µg. cm⁻², et maintenues à 37 °C avec 5 % de CO₂ dans un incubateur. Des plaques de 96 puits ont été ensuiteensemencées, à une densité de 20,000 cellules par puits, et ont été cultivées 48 heures jusqu'à subconfluence. Avant la mise en contact avec les particules de process, les particules ont été cultivées 4 h supplémentaires dans du milieu (sans facteur de croissance (UG) pour cette partie de l'expérience).

2.4.1.1.2 Préparation des particules

Les différentes tailles de particules PM₁₀, PM_{2.5}, PM₁ ont été mises en solution à 2mg. ml⁻¹ dans du milieu nutritif DMEM/F12 (Dulbecco Modified Eagle Medium Nutrient Mix F-12, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) à pH physiologique (pH=7.4) et stockées à 620°C avant utilisation. Avant utilisation, les PM ont été soniquées (Induced

ultrasonic probe, Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France) trois fois pendant 20 s à 60 kW puis diluées dans du milieu de culture sans facteur de croissance.

2.4.1.1.3 Le test de viabilité cellulaire WST-1

2.4.1.1.3.1 Définitions et principe

La cytotoxicité est la capacité d'un agent chimique ou biologique à altérer des cellules. On mesure un effet cytotoxique par le pourcentage de cellules vivantes traitées avec cet agent, par rapport aux cellules vivantes traitées avec le solvant seul.

Il existe de nombreux tests de cytotoxicité, mais ils n'apportent pas tous la même information. Certains estiment une viabilité qualitative comme le test au rouge neutre (colorant vital puisé par les cellules vivantes par transport actif et incorporé dans leurs lysosomes), ou le test à la résazurine (résazurine de couleur bleue réduite en résorufine fluorescente rouge par les cellules vivantes). D'autres, sont plus spécifiques : ils interfèrent avec le métabolisme de la cellule, et indiquent l'organite touché. C'est ce type de test que nous avons appliqué. Ils sont basés sur le clivage des sels de tétrazolium conduisant à un formazan (colorant artificiel provenant de la réduction de sels de tétrazolium). Ces tests sont nombreux, et nous en avons choisi un dont le formazan est soluble dans l'eau. La réaction peut ainsi être lue directement dans le milieu de culture, ce qui permet le dosage des cellules cultivées en suspension : le test WST-1 (Water soluble tetrazolium salt assay).

Certaines particules sont connues pour interférer avec les sels de tétrazolium. C'est le cas notamment des nanotubes de carbone avec le test MMT (Worle-Knirsch et al., 2006). Ces interférences n'ont pas été démontrées pour l'heure pour le test WST-1, considéré comme fiable. Cependant, nous avons fait des tests de mise en contact entre le sel de tétrazolium, et les particules sans cellules pour s'assurer que nos résultats n'étaient pas faussement positifs ou négatifs.

Le test WST-1 (sel de tétrazolium : (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tétrazolium; Roche Diagnostics; Mannheim, Germany)) est un test colorimétrique basé sur le clivage des sels de tétrazolium incolores par les déshydrogénases mitochondriales. Ce sel est converti en formazan jaune après clivage du cycle tétrazolium par les réductases actives de la chaîne respiratoire des mitochondries des cellules vivantes. Les cellules mortes ne peuvent être le siège de ce changement. Le formazan de couleur jaune, est quantifiable par

spectrophotométrie à 420-480 nm, ainsi, plus les cellules sont nombreuses et actives (autrement dit « viables »), plus la couleur est intense.

2.4.1.1.3.2 Mise en oeuvre

Après 4 h de culture sans facteur de croissance, les cellules ont été traitées avec les différentes classes de particules dans du milieu DMEM/F12 (sans rouge phénol) pendant 24 h. Ceci correspond à une exposition aiguë. A la fin de l'exposition, le milieu de culture retiré, les cellules ont été rincées et incubées avec le réactif WST-1 pendant 2 h à 37°C. Finalement, à l'aide d'un lecteur de plaque (DYNEX MRX 5000, Dynatech Laboratories, Chantilly, VA), la densité optique a été mesurée à la longueur d'onde 450 nm.

2.4.1.1.4 Mesure des cytokines excrétées

La mesure des cytokines donne une indication de la réponse inflammatoire de la cellule en cas de non-cytotoxicité.

Après l'exposition des cellules aux particules, les surnageants ont été récupérés et centrifugés à 10,000 g pendant 10 minutes à 4 °C. La concentration en cytokine de type GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor), facteur destiné à stimuler la multiplication des globules blancs, a été mesurée pour quantifier une éventuelle inflammation. Cette concentration a été déterminée par un kit ELISA (R&D Systems Europe; Abingdon, UK) en accord avec les recommandations du fournisseur.

2.4.1.2 Test chimique acellulaire : l'essai DTT

Ce test chimique du potentiel oxydant des particules, a été réalisé à l'Institut Universitaire Romand pour la Santé au Travail à Lausanne au sein de l'équipe « réactivité des particules » (responsable : Michaël Riediker). Ces tests ont été réalisés sous la direction de Jean-Jacques Sauvain, manager du laboratoire d'analyse, avec l'aide de la doctorante Magdalena Sanchez-Holl.

2.4.1.2.1 Principe

Le dithiothréitol (DTT) ou réactif de Cleland (1965) est un agent très réducteur ($E^{\circ} : -0.33 \text{ V}$ à pH 7), dû à sa propension à former un cycle à six atomes avec une liaison

interne disulfide (Cho et al., 2005) et peut-être considéré comme un antioxydant. Le mécanisme d'oxydation du DTT s'effectue en deux étapes (Figure 22). L'intermédiaire DTT-SR n'est pas stable en raison de la présence du deuxième thiol du DTT et de plus, on observe rapidement la cyclisation du DTT.

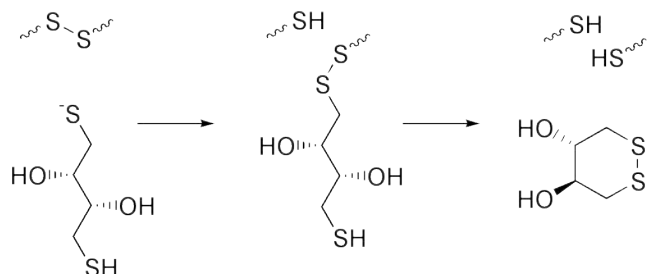
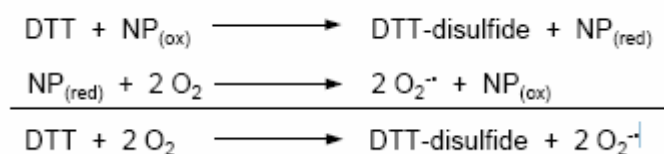


Figure 22 : Mécanisme d'oxydation du DTT en présence d'une liaison disulfide (état oxydé).

Pour réagir correctement, le DTT doit être à un pH supérieur à 7, car c'est la forme déprotonée (thiolate) qui est réactive (pKa ~8.3).

L'utilisation de cette molécule permet de réduire des liaisons disulfides (cas de dimères DNA liés par deux cystéines par ex.) dans des conditions non dénaturantes.

Le mécanisme proposé pour l'oxydation du DTT en présence de particules est décrit ci-dessous (Cho et al., 2005). Cette réaction catalysée par les PM génère des anions superoxyde.



On dose ensuite le DTT restant avec du 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) conduisant à la formation d'acide 2-thio-5-nitrobenzéique détecté par colorimétrie. Sachant la quantité initiale de DDT ajoutée dans le milieu on peut en déduire la quantité de DTT oxydée par les particules.

2.4.1.2.2 Réactifs

Tampon pH = 7.4

Chapitre 2 Matériels et Méthodes

Solution dihydrogénophosphate de potassium 0.1 M (KH_2PO_4) : dans un ballon jaugé de 100 ml, peser environ précisément 1.361 g de KH_2PO_4 Ultra for molecular biology (Fluka, N° 60218, PM : 136.09) et diluer au trait de jauge avec de l'eau bidistillée.

Solution hydrogénophosphate de potassium 0.1 M (K_2HPO_4) : dans un ballon jaugé de 250 ml, peser environ précisément 4.355 g de K_2HPO_4 Ultra (Fluka, N° 60354, PM : 174.18) et diluer au trait de jauge avec de l'eau bidistillée.

Le tampon pH = 7.44 sera préparé en introduisant 50.0 ml de solution KH_2PO_4 0.1 M dans un ballon jaugé de 250 ml puis en complétant au trait de jauge avec la solution de K_2HPO_4 0.1 M.

Vérifier le pH au moyen d'une lecture au pH-mètre.

Tampon pH = 8.9

Solution Tris-HCl 0.4 M - EDTA 20 mM: Dans un cylindre gradué de 50 ml, peser environ précisément 3.152 g de Tris-HCl Ultra (Fluka N° 93358, PM : 157.60) et 0.372 g de $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Microselect (Fluka N° 03679, PM : 372.24). Ajouter un barreau aimanté et environ 15 ml d'eau bidistillée. Dissoudre les sels et ajuster le pH à 8.9 au moyen de NaOH 1 M (environ 15 ml). Transvaser totalement la solution dans un ballon jaugé de 50 ml et compléter au trait de jauge avec de l'eau bidistillée.

Acide trichloroacétique 10%

Dans un ballon jaugé de 25 ml, peser environ précisément 2.50 g d'acide trichloroacétique (Fluka N° 91230, PM : 163.39). Ajouter exactement la masse d'eau pour arriver à une masse totale de 25.0 g.

DTT 10 mM

Dans un ballon jaugé de 50 ml, peser environ précisément 77.27 mg de DL-Dithiothreitol (Fluka N°43819, PM : 154.25). Amener au trait de jauge avec de l'eau. Conserver le réactif sous argon et dans un bain de glace.

DTT 100 μM et autres dilutions

Dans un ballon jaugé de 50 ml, introduire 0.5 ml de la solution DTT 10 mM et diluer au trait de jauge avec le tampon phosphate pH 7.4.

Toutes ces solutions sont à utiliser rapidement et à conserver dans un bain de glace.

DTNB 10 mM

Dans un ballon jaugé de 10 ml, peser précisément 39.6 mg de DTNB (Fluka N° 43760, PM : 396.36). Ajouter 40 gouttes de tampon Tris pH 8.9 et diluer au trait de jauge avec de l'eau.

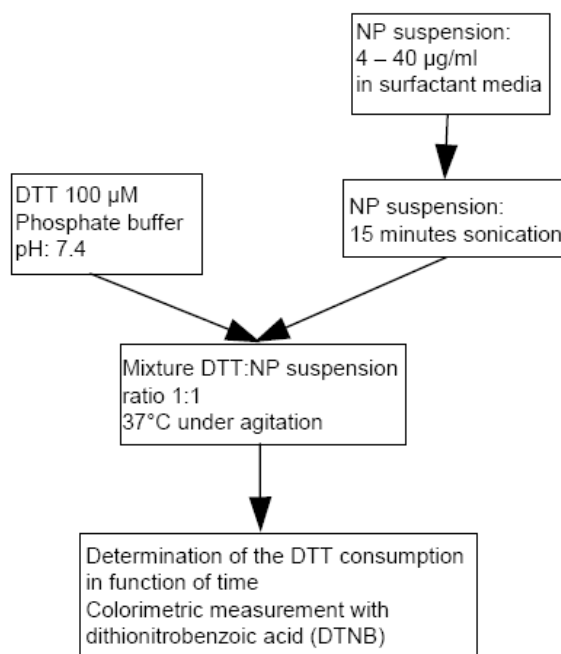
Cette solution est à utiliser rapidement et à conserver dans un bain de glace.

Solution Tween 80® (préparer 500 ml)

Dans un ballon jaugé de 500 ml, peser environ 30 mg de Tween 80® et diluer avec environ 50 ml d'eau bidistillée. Bien mélanger pour dissoudre le Tween 80®. Une fois qu'il est dissout, compléter au trait de jauge avec de l'eau bi-distillée. Cette solution est la solution mère qui est stockée au frigo.

5 ml de la solution mère est diluée dans un ballon jaugé de 500 ml avec de l'eau. C'est cette solution qui sera utilisée pour mettre en suspension les différentes particules testées.

2.4.1.2.3 Protocole



- Dans un ballon jaugé de 100 ml, peser précisément : 5 mg de FW2. Ajouter la solution de tween 80® jusqu'au trait de jauge. Mettre aux ultrasons durant une période de 15 minutes. Prélever 1 ml de cette solution et la diluer dans un ballon jaugé de 50 ml avec la solution de tween 80®. Mettre aux ultrasons durant 15 minutes. 5 mg de Printex 60. Ajouter la solution de tween 80® jusqu'au trait de jauge. Mettre aux ultrasons durant une période de 15 minutes. Prélever 5 ml de cette solution et la diluer dans un ballon jaugé de 25 ml avec la solution de tween 80®. Mettre aux ultrasons durant 15 minutes.
- Préparer 3 tubes à fond conique de 15 ml et les introduire dans un Reactitem réglé à 37°C et permettant l'agitation des tubes (barreau aimanté). Laisser suffisamment longtemps pour que le tube soit à 37°C.
- Dans le tube A (témoin), introduire 5 ml de la solution de surfactant Tween 80®. Introduire 5 ml de la solution de particule dans les tubes B et C (2 réplicats). Tous ces tubes doivent être agités au moyen d'un barreau aimanté.
- Introduire 5 ml de la solution standard DTT 100 µM dans le tube A (témoin), faire partir un chronomètre pour déterminer la durée de la réaction. Agiter brièvement au vortex.
- Introduire 5 ml de la solution standard DTT 100 µM dans les tubes B et C. Agiter brièvement.

- Le plus rapidement possible, prélever 500 µl de chaque tube (A, B, et C) et introduire chaque volume dans un petit tube de 8 ml. Y ajouter 500 µl d'acide trichloroacétique 10% à chacun. Agiter brièvement et relever le temps écoulé.
- Dans chaque tube de 8 ml, ajouter 2 ml de la solution tampon Tris-HCl 0.4M-EDTA 20mM pH 8.4 (pipette Ependorf), puis mélanger gentiment. Ajouter 50 µl de la solution DTNB. Bien agiter. Conserver les tubes dans la glace jusqu'à la mesure d'absorbance.
- Après un pas de temps de 5 min prélever 500 µl de chaque tube (A, B, C) et introduire chaque volume dans un petit tube de 8 ml. Y ajouter 500 µl d'acide trichloroacétique 10% à chacun. Relever le temps écoulé.
- Effectuer des mesures comme pour le point 8 pour différents pas de temps (0, 5, 10, 20, 30, 50 min).
- Mesurer l'absorbance à 412 nm, après avoir calibré au moyen d'un blanc.

2.4.2 Ingestion

Les différentes recherches menées sur le plan international montrent que seule une fraction de la quantité totale d'un polluant est assimilable par un organisme vivant. Chez l'humain, la fraction biodisponible est définie comme la fraction du polluant qui rejoint la fonction systémique.

La notion de **biodisponibilité humaine** n'est pour l'heure, pas prise en compte dans les évaluations de risques sanitaires. Seules les valeurs toxicologiques de références (VTR) servent à quantifier le risque, par comparaison avec la dose d'exposition. Cependant, cette comparaison est biaisée, car elle ne prend pas en compte les différences d'accessibilité entre la matrice d'exposition de la cible et la matrice de référence utilisée pour obtenir la VTR (souvent une matrice liquide ou alimentaire). Ainsi, des études (Dieter et al., 1993; Casteel et al., 1997) ont montré que les VTR surestimaient le risque d'ingestion. Dans le cas de la matrice sol, des tests in vivo soulignent que les polluants ingérés avec du sol sont moins absorbés que les mêmes polluants associés à une matrice liquide ou alimentaire.

La fraction biodisponible peut être approchée par la fraction **bioaccessible** (fraction du contaminant solubilisée dans le tractus gastro-intestinal). Cette dernière est considérée comme supérieure ou égale à la fraction biodisponible.

C'est pourquoi, des expériences de bioaccessibilité ont été réalisées sur les particules de process, à l'INERIS (Institut National des Risques Industriels, Verneuil

en Halatte) sous la direction de Karine Tack, (responsable de laboratoire) et Sébastien Denys, (direction des risques chroniques), et avec l'aide du doctorant Julien Caboche, (thèse sur « la validation de la bioaccessibilité (in vitro) par la biodisponibilité (in vivo) du Pb et de Sb pour le scénario d'ingestion de sol par des enfants »).

Les particules émises aux différents postes de travail, ont été soumises à des tests de bioaccessibilité. Cependant, l'exposition de ces derniers, dépendra en outre de leur poste de travail, de leur comportement (port des EPI (équipements de protection individuels)), degré d'activité (ventilation \pm grande), de l'alimentation et de l'inhalation et/ou ingestion des contaminants par envol de poussières.

Le protocole utilisé provient du groupe européen BARGE en cours de normalisation (www.bgs.ac.uk/barge)

La bioaccessibilité est définie comme la quantité maximale de contaminant qui est libérée de la matrice solide (solubilisée) par les fluides digestifs, et qui devient potentiellement disponible, pour l'absorption à travers la paroi intestinale.

2.4.2.1 Protocole d'estimation de la bioaccessibilité

Ce protocole a été mis au point initialement pour des sols contaminés. Dans le cadre de cette étude des particules ont été utilisées.

2.4.2.1.1 Prise d'essai

Pour chaque échantillon de particules peser deux fois 0,1g (+/- 0,05) afin d'obtenir deux sous-échantillons, l'un représentant la « phase gastro-salivaire » et l'autre la phase « gastro-intestinale ». De plus, des répliqués sont réalisés pour chaque échantillon. Pour chaque roulement :

- utiliser un échantillon représentant un « blanc gastrique » ;
- utiliser un échantillon représentant un « blanc gastro-intestinal » ;
- utiliser un matériau de référence (SMR 2710 ou SMR 2711).

2.4.2.1.2 Préparation des solutions d'extraction

Les solutions sont préparées la veille puis mises en agitation toute la nuit. La composition de chaque solution digestive est présentée dans le tableau 1. Pour chaque solution digestive, 250 ml d'une solution « inorganique » et 250 ml d'une solution « organique » sont préparés. Finalement, des réactifs (enzymes notamment) sont ajoutés et ainsi 500 ml de solution digestive sont obtenus.

	Solution salivaire (pH = 6,5 ± 0,5)	Solution gastrique (pH = 1,0 ± 0,2)	Solution duodénale (pH = 7,4 ± 0,2)	Solution biliaire (pH = 8,0 ± 0,2)
Solution inorganique*	448 mg de KCl 444 mg NaH ₂ PO ₄ 100 mg KSCN 285 mg Na ₂ SO ₄ 149 mg NaCl 0,9 ml NaOH à 1 M	1376 mg de NaCl 133 mg de NaH ₂ PO ₄ 412 mg de KCl 200 mg de CaCl ₂ 153 mg de NH ₄ Cl 4,15 ml HCl (37%)	3506 mg de NaCl 2803 mg de NaHCO ₃ 40 mg de KH ₂ PO ₄ 282 mg de KCl 25 mg de MgCl ₂ 90 µl HCl (37%)	2630 mg de NaCl 2893 mg de NaHCO ₃ 188 mg de KCl 90 µl HCl (37%)
Solution organique*	100 mg d'urée	325 mg de glucose 10 mg d'acide glucuronique 42,5 mg d'urée 165 mg d'hydrochloride de glucosamine	50 mg d'urée	125 mg d'urée
Réactifs à ajouter aux solutions	72,5 mg d'alpha-amylase 25 mg de mucine 7,5 mg d'acide urique	500 mg de BSA* 1500 mg de mucine 500 mg de pepsine	100 mg de CaCl ₂ 500 mg de BSA 1500 mg de pancréatine 250 mg de lipase	111 mg de CaCl ₂ 900 mg de BSA 3000 mg de bile de porc

*BSA = Bovine Albumin Serum

* masses indiquées pour 250 ml de solution

Tableau 3 : Composition des solutions digestives pour le test in vitro UBM

2.4.2.1.3 Extraction gastro-salivaire

Mise en contact des particules avec la solution salivaire (pH=6,5 ± 0,5) puis ajout de la solution d'extraction stomacale (pH=1). Après une heure d'agitation, l'échantillon gastrique a un pH final de 1,2-1,7. Il est centrifugé à 3000g pendant 10min, le surnageant est prélevé puis analysé par ICP-OES.

2.4.2.1.4 Extraction intestinale

Les particules ont été mises en contact avec la solution intestinale (pH=6,3 ± 0,5) puis une agitation pendant 4H a été réalisée. L'échantillon gastro-intestinal a un pH final de 6,3 ± 0,5, il est centrifugé à 3000g pendant 10 min, puis le surnageant a été dosé par ICP-OES.

2.4.2.1.5 Déroulement étape par étape du test de bioaccessibilité :

- Mettre l'étuve à 37 ± 2 °C. Etalonner le pH-mètre.
- Mettre à chauffer les fluides digestifs (préparés la veille) à 37 ± 2 °C, deux heures au moins avant utilisation dans le test de bioaccessibilité.
- Le pH de chaque solution (salivaire et gastrique dans un premier temps) est mesuré et doit être dans la gamme indiquée dans le tableau 1. Dans le cas échéant, ajuster les solutions avec de l'acide chlorhydrique (37%) ou de la soude à 10M. De plus, vérifier que l'échantillon blanc « gastrique » (9ml solution salivaire + 13,5 ml solution gastrique) est dans la gamme de pH 1,2-1,7.
- Ajouter exactement, via une micropipette, 9,0 ml de solution salivaire à chaque échantillon.
- Boucher chaque réacteur et mélanger manuellement pendant environ 5 à 15 minutes.
- Ajouter exactement, à chaque réacteur via une micropipette, 13,5 ml de solution gastrique.
- Vérifier que le pH du mélange « particules + solutions digestives » est compris entre 1,2-1,7.
- Pour les particules dont le pH du mélange «particules + solutions digestives » est en dehors de la gamme, ajuster à l'aide d'acide chlorhydrique pour que celui-ci soit dans la gamme 1,2-1,7.
- Placer les réacteurs dans l'étuve à 37 ± 2 °C et les mettre en agitation (end-over-end) pendant 1h.
- Mesurer et noter le pH de chaque surnageant («gastrique » et « gastrique + intestinal»). Si le pH d'un surnageant n'est pas compris entre 1,2 et 1,7, l'extraction pour les deux sous-échantillons (« stomacale » et « stomacale + intestinale ») doit être recommencée lors d'un prochain roulement afin de ne pas sous-estimer la bioaccessibilité. Pour cette nouvelle extraction des sous-échantillons, ajouter dès le début à la solution gastrique de l'acide chlorhydrique à 37%, puis attendre une quinzaine de minutes pour vérifier que le pH est toujours dans la gamme requise (sinon ajouter de nouveau HCl).
- Si le pH de la solution est dans la gamme de pH requis, collecter les sous-échantillons correspondant à la phase « stomacale » puis les centrifuger à 3000 g pendant 5 minutes. Récupérer le surnageant et le placer à une $T^{\circ} < 8^{\circ}\text{C}$ avant la détermination de la bioaccessibilité gastrique des contaminants. L'analyse de l'échantillon doit être réalisée au plus tard dans la semaine suivant la génération de l'échantillon.

- Le pH de chaque solution (duodénale et biliaire) est mesuré et doit être dans la gamme indiquée dans le tableau 1. Le cas échéant, ajuster les solutions avec de l'acide chlorhydrique (37%) ou de la soude à 10M. Vérifier que l'échantillon blanc « gastro-intestinal » (9 ml solution salivaire + 13,5 ml solution gastrique + 27 ml solution duodénale + 9 ml solution biliaire) est dans la gamme 5,8-6,8.
- Pour les sous échantillons représentant la phase « gastrique + intestinale » ajouter, via une micropipette, 27,0 ml de solution duodénale et 9,0 ml de solution biliaire.
- Bouchonner les réacteurs et agiter manuellement.
- Ajuster, si nécessaire, le pH de chaque échantillon à $6,3 \pm 0,5$ avec quelques gouttes d'acide chlorhydrique 37% ou d'une solution NaOH 10M.
- Replacer les échantillons dans l'étuve à 37 ± 2 °C et les mettre en agitation (end-over-end) pendant 4 h.
- Récupérer les échantillons puis mesurer et enregistrer le pH de chaque suspension de sol. Le pH doit être de $6,3 \pm 0,5$.
- Collecter les sous-échantillons correspondant à la phase « gastrique + intestinale » par centrifugation des suspensions de sol à 3000 g pendant 5 minutes. Récupérer le surnageant et l'acidifier avec 0,5 ml d'acide nitrique. Ensuite, placer l'échantillon à une $T < 8^{\circ}\text{C}$ avant la détermination de la bioaccessibilité intestinale des contaminants. L'analyse des échantillons doit être réalisée par ICP-OES ou ICP-MS.

2.5. Références bibliographiques

- Alexander, P., B. Alloway, et A. Dourado. 2006. Genotypic variations in the accumulation of Cd, Cu, Pb and Zn exhibited by six commonly grown vegetables. *Environmental Pollution*. 144(3): 736-745.
- Casteel, S.W., R.P. Cowart, C.P. Weis, G.M. Henningsen, E. Hoffman, W.J. Brattin, R.E. Guzman, M.F. Starost, J.T. Payne, S.L. Stockham, S.V. Becker, J.W. Drexler, et J.R. Turk. 1997. Bioavailability of Lead to Juvenile Swine Dosed with Soil from the Smuggler Mountain NPL Site of Aspen, Colorado. *Fundamental and Applied Toxicology*. 36(2): 177-187.
- Cho, A.K., C. Sioutas, A.H. Miguel, Y. Kumagai, D.A. Schmitz, M. Singh, A. Eiguren-Fernandez, et J.R. Froines. 2005. Redox activity of airborne particulate matter at different sites in the Los Angeles Basin. *Environmental Research*. 99(1): 40-47.
- Dieter, M., H.B. Matthews, R. Jeffcoat, et R. Moseman. 1993. Comparison of lead bioavailability in F344 rats fed lead acetate, lead oxide, lead sulfide, or lead ore concentrate from Skagway, Alaska. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 39(1): 79-93.
- Houba, V.J.G., T.M. Lexmond, I. Novozamsky, et J.J. van der Lee. 1996. State of the art and future developments in soil analysis for bioavailability assessment. *Science of The Total Environment*. 178(1-3): 21-28.
- Khan, S., L. Aijun, S. Zhang, Q. Hu, et Y. Zhu. 2008. Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals in lettuce grown in the soils contaminated with long-term wastewater irrigation. *Journal of Hazardous Materials*. 152(2): 506-515.
- Meers, E., R. Samson, F.M.G. Tack, A. Ruttens, M. Vandegehuchte, J. Vangronsveld, et M.G. Verloo. 2007. Phytoavailability assessment of heavy metals in soils by single extractions and accumulation by *Phaseolus vulgaris*. *Environmental and Experimental Botany*. 60(3): 385-396.
- Menzies, N.W., M.J. Donn, et P.M. Kopittke. 2007. Evaluation of extractants for estimation of the phytoavailable trace metals in soils. *Environmental Pollution*. 145(1): 121-130.
- Ravel, B., et M. Newville. 2005. ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. *J. Synchrotron Rad.* 12(4): 537-541.
- Sarret, G., A. Manceau, D. Cuny, C. Van Haluwyn, S. Deruelle, J. Hazemann, Y. Soldo, L. Eybert-Berard, et J. Menthonnex. 1998. Mechanisms of Lichen Resistance to Metallic Pollution. *Environmental Science & Technology*. 32(21): 3325-3330.
- Scheinost, A.C., S. Abend, K.I. Pandya, et D.L. Sparks. 2001. Kinetic Controls on Cu and Pb Sorption by Ferrihydrite. *Environmental Science & Technology*. 35(6): 1090-1096.
- Sobanska, S., N. Ricq, A. Laboudigue, R. Guillermo, C. Bremard, J. Laureyns, J.C. Merlin, et J.P. Wignacourt. 1999. Microchemical Investigations of Dust Emitted by a Lead Smelter. *Environmental Science & Technology*. 33(9): 1334-1339.
- Uzu, G., S. Sobanska, Y. Aliouane, P. Pradere, et C. Dumat. 2009. Study of lead phytoavailability for atmospheric industrial micronic and sub-micronic particles in relation with lead speciation. *Environmental Pollution*. 157(4): 1178-1185.
- Waisberg, M., W.D. Black, C.M. Waisberg, et B. Hale. 2004. The effect of pH, time and dietary source of cadmium on the bioaccessibility and adsorption of cadmium to/from lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. *Ostinata*). *Food and Chemical Toxicology*. 42(5): 835-842.
- Worle-Knirsch, J.M., K. Pulskamp, et H.F. Krug. 2006. Oops They Did It Again! Carbon Nanotubes Hoax Scientists in Viability Assays. *Nano Letters*. 6(6): 1261-1268.

Chapitre 3

Caractérisation des particules

3.1. Avant propos

L'introduction générale, nous a permis de souligner le rôle indispensable de la caractérisation préalable des particules, comme point de départ pour discuter de leur réactivité. Les émissions particulaires d'une usine de recyclage de plomb sont riches en métaux, et constituent des ensembles très hétérogènes sur le plan physico-chimique. Le procédé produit à la fois, des particules fines et grossières, dont le spectre granulométrique, s'étend de quelques nanomètres à quelques centaines de micromètres. La détermination pour les particules, de la proportion des éléments toxiques pour l'homme ou l'environnement, est une condition nécessaire mais non suffisante, pour évaluer leur réel potentiel toxique. En effet, la toxicité d'un élément dépendra de sa biodisponibilité pour les organismes, qui est directement reliée à la spéciation de l'élément et à sa taille. La forme chimique de l'élément contrôle plus particulièrement sa solubilité, et la taille des particules influence les phénomènes de physisorption (effet de charge qui augmente lorsque la taille diminue).

Dans l'environnement, un élément métallique est présent sous de nombreuses formes dont la toxicité varie en particulier avec la stabilité de la forme chimique présente dans le milieu. La détermination exhaustive de ces formes chimiques est donc indispensable, si l'on veut comprendre leur réactivité ultérieure sur les organismes.

Ce premier volet de thèse caractérise donc la spéciation des particules par classe de taille. En effet, l'environnement est impacté par l'ensemble des particules émises. Cependant, pour l'homme, seule la fraction inférieure à 10 μm de diamètre est inhalable. Il est donc nécessaire de caractériser particulièrement les particules les plus fines ($\text{PM}_{10/2.5}$).

Ce chapitre se présente sous la forme d'une publication en cours de soumission dans le *Journal of Hazardous Materials*.

Characterization of lead-recycling facility emissions at various workplaces using a complementary approach.

G. Uzu, S. Sobanska, G.Sarret , P.Pradère and C. Dumat.

3.2. Characterization of lead-recycling facility emissions at various workplaces using a complementary approach.

G. Uzu^{1,2}, S. Sobanska³, G.Sarret⁴, P.Pradère⁵ and C. Dumat^{1,2*}

¹Université de Toulouse ; UPS, INP ; EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle) ; ENSAT, Avenue de l'Agrobiopôle, F-31326 Castanet-Tolosan, France

²CNRS ; EcoLab ; F-31326 Castanet-Tolosan, France

³LASIR UMR 8516, Univ Lille I, CNRS, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

⁴LGIT UMR 5559, Univ. J. Fourier ; CNRS, 38041 Grenoble cedex 9, France

⁵ STCM, 30-32 avenue de Fondeyre, 31200 Toulouse, France.

* Corresponding author: Camille Dumat. Tel.: 33 (0)5 62 19 39 03; fax: 33 (0)5 62 19 39 01. E-mail address: camille.dumat@ensat.fr.

Keywords : Smelter emissions, lead, PM_{10/2.5}, speciation, risk assessment.

3.2.1 Introduction

In 2007, 3,770,000 tons of lead were produced around the world [1]. In Europe, 4800 tons of lead were released in the atmosphere for the same period [2]. Since 2000, lead is mainly emitted by industrial activities. This metal is used for multiple applications in electronics, medicine, automobile industry, but it is toxic for human [3]. Therefore, sanitary protections have been settled in industry to prevent workers exposure, particularly concerning the fine particle inhalation. Since 2007, in Europe, REACH legislation imposes to realize “exposure scenarios” so to recommend adapted personal protective equipment.

In this context, it's necessary to characterize lead emissions in particular for lead-recycling facilities, a source of lead emissions in the atmosphere [4]. Particulate Matter (PM) emitted by lead recycling facilities represents a source for lead exposure towards environment and workers of these plants. Diffused particles with various size (aerodynamic diameter under 10 μm : PM_{10} , 2.5 μm $\text{PM}_{2.5}$ and 1 μm PM_1 and nanoparticles : $\text{PM}_{0.1}$) emitted at workplaces are a source of exposure of workers via inhalation and ingestion and are considered as health hazards [5]. Currently, the monitoring of industrial emissions is limited to the measurement of total amounts of lead in total suspended particles (TSP), PM_{10} and $\text{PM}_{2.5}$ according to European PM regulation [6][7][8]. These measurements are insufficient because they only give some indication on the level of pollution [9]. According to Ruby et al., [10] potential effects on health depend mainly on size distribution and chemical speciation of Pb which govern its availability in biological fluids or soils. Ruby et al. showed that the bioaccessibility of lead strongly increased for particles under 2.4 μm [18]. In addition, the speciation may evolve in a short time scale after emission, for instance by physico-chemical reactions occurring in the atmosphere. The products of these reactions may be less toxic than the original particles, but possibly more toxic. In this context, it is necessary to characterize process emissions after collection and after an ageing period. The determination of metal speciation in particular could help to assess sanitary risks.

In a previous study, $\text{PM}_{10/2.5}$ of channelled emissions from a lead recycling plant were characterized in relation with soil-plant transfer [11]. In addition of channelled emissions, the process of a secondary smelter also produces fugitive emissions which remain to be characterized. At workplaces, people are exposed to these particles and toxicology needs to be established [12]. However, most available studies on lead plant emissions studied the particles environmental impact [13][14][4].

They rarely focused on the environment of workplaces [15], whereas PM characteristics are responsible for biological effects [12][16].

The objective of this study was to characterize physically and chemically the Pb-rich particles emitted at different workplaces of a lead recycling plant, and channeled emissions. This study focuses on lead speciation the main pollutant occurring in the particles. These data were then compared to point out differences among units of the plant. Process emissions by lead-smelters present a great heterogeneity concerning size, chemical composition and speciation [17]. Consequently, a multi-scale characterization was needed to assess all their properties, from bulk analysis to the level of individual particle. Individual particle investigations provide information about physico-chemical heterogeneity within one particle that could be valuable to better understand their toxicity and/or bio availability of bulk particles. This study combines chemical methods (acid digestion and bioavailable fraction extraction) and physical techniques providing the description of lead speciation in the particles. The particle size distribution and the amount of inhalable particles ($< 10 \mu\text{m}$) provided first insights on workers exposure. Elemental total contents brought elements concentrations whose could be deduced the proportions of potential toxics elements for humans. Environmental scanning electron microscopy (ESEM) provided insights on the morphology of individual particles, which can influence their transfer towards biosphere. Speciation of elements within samples was attended by several physical techniques. For crystallized compounds with an abundance superior to 5% in weight, speciation was obtained with X-Ray Diffraction. Raman microspectrometry measurements (RMS) were done on individual particles for semi-quantitative speciation. In parallel, an estimation of the bioavailable fraction with a simple in-vitro test (0.01M CaCl_2) was performed as a first step towards reactivity [19]. The knowledge of physical and chemical properties are prerequisite for understand particles reactivity

To our knowledge, this is the first multi-scale study describing particles properties in working environment of a secondary lead smelter.

3.2.2 Experimental Section

3.2.2.1 Particle sampling and size separation.

A secondary lead smelter, which currently recycles batteries, was chosen as a representative example of the smelter metal industry. The context and plant process

had been previously described [11]. Particles from working areas and channeled emissions from a lead-recycling plant were sampled.

Particles were collected in two working units including (i) the smelter where lead pastes from broken batteries are processed in rotary furnaces at 1200°C (noted Furnace PM) and (ii) the refinery where lead is purified from unwanted metals or enriched (noted Refining PM). Channeled Emissions PM were sampled before filters used in the facility (PM₁₀ inlet electro filter retaining particles whose aerodynamic diameter exceeds 10 µm) in order to collect sufficient amounts of particles. Thus, they are coarser than those actually emitted in the atmosphere. In order to study representative particles, a size segregation was then performed using a 10µm filter. According to Sobanska et al. [17], filters should not modify the speciation of Pb contained in the dust.

Particles presented a great heterogeneity, so they were size-segregated by artificial resuspension in a Teflon bag [20] and collected by impaction onto a PM_{10/2.5} Dekati inertial impactor. The cascade impactor consists of two successive stages with aerodynamic cut-off diameters of 10 and 2.5 µm (noticed PM₁₀ and PM_{2.5} respectively) when it operates at 10 L/min airflow. Bulk particles were noted PM_{tot}.

3.2.2.2 Characterization of particles

Size distribution of particles was determined by laser granulometric analyses using a Malvern Mastersizer S, which permitted particles size measurement in the range of 900 µm-0.05 µm. Dust samples were dispersed in alcohol to avoid potential hydrophobic agglomeration and sonicated during 10 minutes [21].

Elemental total contents of the PM_{tot/10/2.5} bulk samples were determined by ICP-MS after heated digestion with standard acid (HNO₃, HCl and HF, Suprapur, Merk) in a PTFE vessel and filtration (Millex syringe 0.22 µm). Levels of C, S and O were determined after burning of in an elemental analyser with coulometric-catharometric detection and IR.

X-ray diffraction patterns of PM_{tot/10/2.5} samples were recorded on an INEL diffractometer equipped with a curved detector CPS 120 and Co (Ka) radiation allowing a 120_/2q detection. Crystallized compounds were identified by comparison with the diffraction patterns of the JCPDS database. The relative abundance of each crystallized phase detected in samples was qualitatively estimated by using the

relative intensity of the strongest X-ray pattern peaks of each considered phase. To assess the potential aging effects on stocked particles, a new X-ray diffraction analysis was performed one year after first analysis on PM_{tot}.

Morphology of individual particles was observed from secondary electron images recorded by an Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM) Quanta 200 FEI instrument working in low-vacuum mode. ESEM was operated at 10–25 kV. Particles were dispersed on carbon substrates and analyzed without further preparation. Because of the ESEM configuration, light element detection (C, N, and O) was ambiguous. Pb and S peaks were separated by using the automated program provided by the constructor.

Molecular identification of species within individual particles was performed by Raman microspectrometric measurements with a LabRAM confocal spectrometer (Jobin Yvon, Horiba Gr, France). The Raman backscattering was excited at 632.8 nm by an internal, air-cooled, linearly polarized helium–neon laser. The laser beam was focused on the particle surface through an optical objective (Olympus objective, X100, 0.9 NA) given a lateral resolution (XY) of about 1 μm^2 . The power delivered to the surface particle was less than 8mW. A liquid nitrogen-cooled CCD (Jobin Yvon, 2048 pixels \times 512 pixels) was used for detection. The glass plate with the impacted particles was mounted on the microscope stage without any further preparation. Data acquisition consisted in recording many spectra in point-by-point scanning mode with 1 μm as a minimum step, one accumulation and 30s spectrum acquisition time. In order to gain a representative analysis of molecular composition of particles we recorded large areas of the samples (60 X 30 μm) in automated mode. So for each area, a total of 1800 spectra are recorded and simultaneously treated using Multivariate Curve Resolution (MCR) to extract the main spectrum from the whole data set. Further details concerning the data treatment can be found elsewhere [22].

Identification of species is obtained by comparison (Raman band positions and relative intensities) between extracted Raman spectra and reference spectra using Spectral Library Search ID 301 software.

3.2.2.3 Extraction of bioavailable fraction

For the determination of the bioavailable fraction, neutral salts extractants provide the most useful indication [23]. Among neutrals salts, the 0,01 M CaCl₂ extraction procedure is the most versatile. It gives a good indication of phytoavailability for Zn, Cu,

Pb, Ni and Cd whereas other salts are specific of one element [24]. As a consequence, only CaCl_2 was indicated in the case of multimetallic PM. Process particles and solution of 0.01 M CaCl_2 were mixed in 1:10 (g:ml) ratio [19]. Extraction was carried out on 1 g process samples of $< 300 \mu\text{m}$ as well as sieved fractions of 10-2.5 and $< 2.5 \mu\text{m}$. Experiment was performed in 50ml polypropylene centrifugation tubes placed on a shaker table (Heidolph promax 1020) at 50 oscillations/min during 2h, 20°C [19]. The filtered supernatant ($0.22\mu\text{m}$) was acidified at 2% with bidistilled HNO_3 (15N, suprapur 99, 9%) and stored at 4°C for analysis.

3.2.3 Results and discussion.

3.2.3.1 Granulometric distribution

Table 1 presents the volumetric percentages of the six ranges of size determined for the PM collected in the three places, i.e., refining, furnace and emissions. Distribution is given in volume percent for particle size ranges representing the volume mean diameter of equivalent spheres. Results are the mean of ten replicates.

Table 1 : Granulometry of PM emitted by the lead recycling process.

% volumique	Refining PM	Furnace PM	Emissions PM
<u>$<1 \mu\text{m}$</u>	2.4	7.4	21.0
1 - 2,5 μm	2.1	6.3	19.9
2,5 - 10 μm	16.7	14.0	50.0
10 - 30 μm	56.4	38.4	8.2
30-100 μm	22.4	30.2	0.9
$> 100 \mu\text{m}$	0.0	3.7	0.0

**the main size fraction was underlined and secondary were put in grass police.*

All particles samples show a large distribution of the particle size between 0 and 100 μm . Moreover, these granulometry results showed differences among workplaces and channeled emissions. Working places present a main amount of coarse particles whereas the *Emissions PM* have a majority of fine particles. Particles emitted through smokestack are expected to present the *Emissions PM* granulometry cut at 10 μm . However 90% are less than 10 μm , showing that main part of *Emissions PM* are likely to be emitted in the environment. Moreover, a study of Sobanska et al. [17] found

analogous size distribution and after filtration. Efficiency of electrofilters seems to be dependent on the quantity of particles retained on the filter. Inhalable fraction (<10µm) represents 21%, 27.7% and 90% in Refining PM, Furnace PM, and Emissions PM, respectively. The proportion of particles under 2.5 µm, which represent an additional hazard for being able to penetrate in the deep lung [25][26], increased from refining PM, furnace PM and emissions PM: 1.9%, 6.1% and 13.9%, respectively. Since workers are protected with dust FFP3 (Norm EN149) masks stopping 98% of 0.6µm particles, their final exposure is sharply decreased. However, fine emitted particles represent a potential risk for humans (not protected with a mask outside of the plant) and environment of the surroundings.

3.2.3.2 Elemental total contents

Elementary compositions of particle samples from the three different origins as function of particle sizes are presented in Table 2. All the results are given as the mean of the three replicates for each sample (PM_{tot} PM₁₀ and PM_{2.5}) and standard deviations never exceed 7%.

All samples contain extremely high levels of Pb (25 to 45%) and high levels of other metals and metalloids: Cd, Cu, As... Each source of particles can be characterized through its specific elemental composition: Cd is particularly concentrated in the channeled emissions (2.3 to 2.7%). Its presence is related to the unwanted occasional presence of Cd-Ni batteries. Refining PM contain the highest amounts of Sb (1.9-2.1%), Cu (0.6-0.7%), As (0.3-0.6%), and Ni (0.1-0.4%) which is logical since in the refining unit, lead is mixed with other metals to obtain alloys. Furnace PMs are the richest concerning C (4-6%), Fe (2-5%) and Na (7-10%). Na is added in the furnace to lower the melting point of Pb. Finally, differences are noticed among secondary elements but not in major components. The remaining elements to complete to 100% are expected to be chloride and others metals. Chloride can originated from decomposition of PVC separators and box of batteries.

There were differences in elemental composition as a function of the particle size, but no general trend was observed. It is true that several mechanisms are involved during the process that can induce changes in particle elemental contents: volatilization, formation of solid-solutions, co-precipitations...[4]. Theses numerous reactions may induce variations in metals concentrations with no simple relationship as function of size or origin. Concerning transfers towards biosphere, or toxicity, competition or/and synergy effects could be promoted between the numerous metals present in particles.[27][28]. Finally, these results of metal concentration point out the difficulty to

interpret field data with multimetallic contamination. In fact, on the one hand this kind of study allows getting data from real situations but on the other, complexity and heterogeneity of particles unable to link reactivity and characteristics.

Chapitre 3 Caractérisation des particules

Sample	Al	As	Cd	Cu	Fe	Na	Ni	Pb	Sb	Zn	S	C	O
Contents mass % ± 1%													
Refining													
PM _{tot}	0.07	0.3	0.2	0.6	1.3	2.2	0.5	41	1.9	0.2	2.9	2.2	20.5
PM ₁₀	0.08	0.6*	0.2	0.7	1.4	5.9*	0.3*	32*	2.3	0.4*	7.2*	4.1*	19.2
PM _{2.5}	0.09	0.5*	0.2	0.7	1.4	8.9**	0.2*	32.3*	2.1	0.4*	7.4*	4.3*	20
Furnace													
PM _{tot}	0.1	0.06	0.2	0.2	5.7	6.8	0.08	25.7	5.5	0.2	2.8	4.6	20.1
PM ₁₀	0.07	0.08	0.4	0.2	4.5*	10.3*	0.05	45.2*	6.0	0.3	7.6*	6.5*	21
PM _{2.5}	0.05*	0.08	0.7*	0.1*	2.1**	8.3**	0.02*	38*	4.9	0.4*	8.2*	5.1*	20.1
Emissions													
PM _{tot}	0.02	0.09	2.7	0.09	1.2	5.0	0.02	33.4	1.8	0.7	3.3	1	15
PM ₁₀	0.005*	0.08	2.3*	0.06*	0.4*	4.0*	0.009*	26.7*	1.4	0.5	7.4*	1.2	15.1
PM _{2.5}	0.001*	0.09	2.5*	0.05*	0.1**	3.2*	0.004*	27.3*	1.3	0.5	7.8*	1.2	14.9

Table 2 : Elemental total contents. (results are expressed as the mean of three replicates). *, ** significant differences ($p < 0.05$) as measured by an LSD fisher test (one-factor ANOVA).

3.2.3.3 Speciation results

XRD patterns for $PM_{10/2.5}$ of each source of particles provide identification of major crystallized species for each fraction (Table 3). For all samples, the diffractograms contain numerous peaks and allowed the identification of numerous metal species.

Table 3 : Determination of main chemical speciations of lead in the samples by X-Ray Powder Diffraction Analysis.

X-Ray Diffraction	
Refining	
PM_{tot}	Pb, PbS, PbO.PbSO ₄ , Pb(ClO ₄) ₂ , Pb ₂ As ₂ O ₇ , CdSO ₄ , CdS and Na ₂ SO ₄
PM_{10}	idem PM_{tot} + ZnO
$PM_{2.5}$	idem PM_{10}
Furnace	
PM_{tot}	Pb, PbS, PbO.PbSO ₄ , Pb(ClO ₄) ₂ , Pb ₂ As ₂ O ₇ , CdSO ₄ , CdS and Na ₂ SO ₄
PM_{10}	Idem PM_{tot} + ZnO, ZnSO ₄
$PM_{2.5}$	Idem PM_{tot} + 2PbO.PbSO ₄
Emissions	
PM_{tot}	Pb, PbS, PbO.PbSO ₄ , Pb(ClO ₄) ₂ + CdSO ₄ , Cd(ClO ₄) ₂ and Na ₂ SO ₄ , Na ₂ SO ₄
PM_{10}	Idem PM_{tot}
$PM_{2.5}$	Idem PM_{tot} + FeS ₂

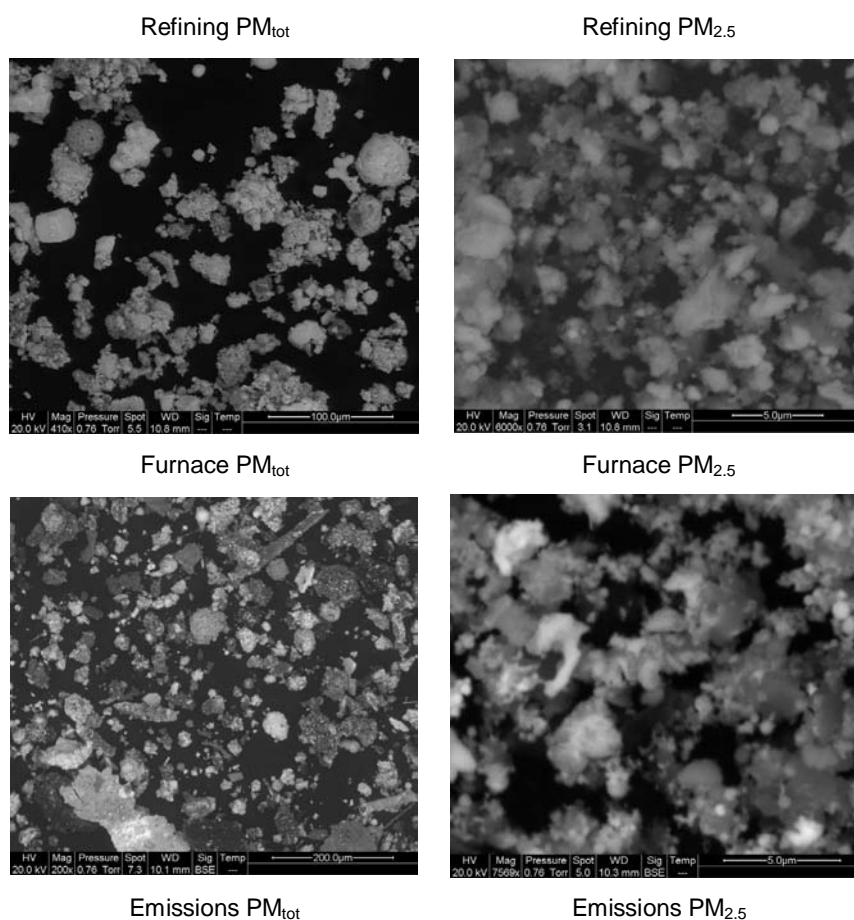
Regardless of their origin, particles are mainly composed of metallic sulfates and sulfides, oxides, oxisulfates, perchlorates and sodium sulfate (NaSO₄). Few differences appear between samples. Supplementary phases are present in the finest fraction: ZnO and ZnSO₄ are detected in *Furnace* PM_{10} and 2PbO.PbSO₄ in *Furnace* $PM_{2.5}$ whereas they were not found in *Furnace* PM_{tot} . ZnO appears only in *Refining* $PM_{10/2.5}$. For *Emissions* *PM*, the same crystallized phases were found within PM_{tot} and PM_{10} , but FeS₂ was detected in $PM_{2.5}$. Chlorine-containing species (Pb(ClO₄)₂, Cd(ClO₄)₂) may have formed from polymer membranes of batteries. Finally *Refining* *PM* is the only source where an As specie was clearly detected.

A XRD analysis performed on particles after one-year of storage in plastic bags in the dark at 4°C with a dessicant indicated that PbS in *Emissions* *PM* and *Furnace* *PM* had been replaced by PbO.PbSO₄ (lanarkite). This latter mineral is a product of the oxidation or photo-oxidation of PbS [22][29]. Thus, despite the relatively protective storage conditions, Pb speciation was changed in part. This ageing effect underlines

the great reactivity of the particles and the importance of storage conditions and regular checking. This result was confirmed by EXAFS experiment realized in the same time (cf. Chapter 3 Transfer atm-plant) which identified Pb species in *Emissions PM* as 44% PbO.PbSO₄ + 30% αPbO + 16% Pb-sorbed ferrihydrite + 14% βPbO (NSS = 0.074). The three Pb minerals (PbO.PbSO₄, αPbO and βPbO) were previously identified by XRD and micro-Raman spectroscopy [11], and Pb-sorbed ferrihydrite couldn't have been detected by XRD. According to lead kinetics of dissolution [18] [30], PbO.PbSO₄ would be more available than PbS leading to a possible greater transfer to the biosphere. This ageing effect suggests that particles should evolve quickly after their release in the environment. These results are in agreement with a fast evolution of speciation noticed for atmospheric PM in the air [31] and PM in soil after atmospheric fallout [32].

3.2.3.4 Individual particle analysis:

3.2.3.4.1 Morphology



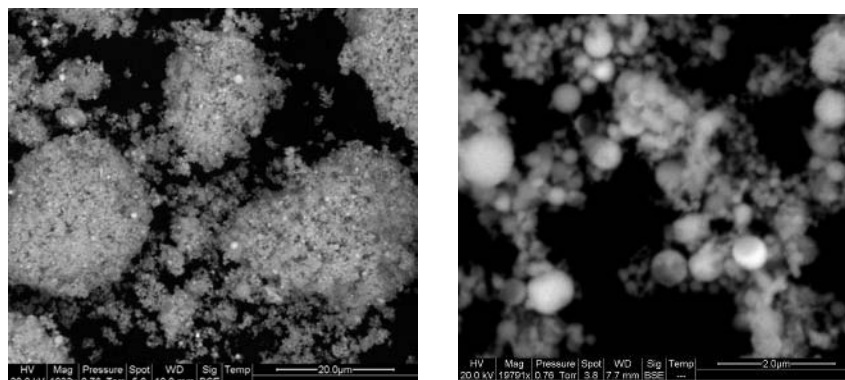


Figure 23 : SEM observations on PM of different sources.

SEM observations on PM samples revealed differences according to the particle sizes and workplaces. For PM_{tot} samples, Emissions PM exhibit large aggregates of 20 μm diameter composed of many micron-sized particles whereas Furnace and Refining PM contain individualized particles ranging between 10 and 200 μm and characteristic features, ie, cubes, needles. Among sources of particles, Emissions PM are made of agglomerated balls whereas Furnace and Refining PM exhibited a mix between crystallized and no well-defined shapes particles. Balls of Emissions PM are due to fusion process. Concerning health effects, shape is important and may be at the origin of biological effects. For asbestos, fibre size and shape play an important part in pro-inflammation of lungs [33]. Other studies on intravenously-administered colloidal particles proved that the blood clearance was less efficient for fibres or irregular shapes than microspheres [34][35]. Large cellulose fibres, 30 μm diameter, proved to be toxic whereas large cellulose microspheres were well tolerated [36]. Keeping all these considerations, particles from Furnace PM and Refining PM should present a greater retention in lungs.

3.2.3.4.2 Individual particle speciation.

Table 4 : Determination of major (bold) and minor chemical speciations of lead in the samples by Raman microspectrometry

Raman Microspectrometry	
Refining	
PM _{tot}	4PbO.PbSO₄, PbSO₄, α-PbO, Na₂SO₄ + PbCO ₃ , Pb ₃ (CO ₃) ₂ (OH) ₂ , and (Fe,x) ₃ O ₄ .
PM ₁₀	Idem PM _{tot}
PM _{2.5}	PbO.PbSO₄, PbSO₄ , PbCO ₃ , α-PbO, Na₂SO₄ , and α-Fe ₂ O ₃ .
Furnace	
PM _{tot}	PbO.PbSO₄, PbSO₄, α-PbO, Na₂SO₄ , and PbCO ₃
PM ₁₀	Idem PM _{tot} +β-PbO, ZnSO ₄ , and α-Fe ₂ O ₃
PM _{2.5}	Idem PM _{tot} + α-Fe ₂ O ₃ , (Fe,Zn) ₃ O ₄ , and Fe ₃ O ₄
Emissions	
PM _{tot}	PbO.PbSO₄, α-PbO , β-PbO, Na₂SO₄ , (Fe,Zn) ₃ O ₄ , c
PM ₁₀	PbO.PbSO₄, α-PbO, PbSO₄ , PbCO ₃ , Na₂SO₄ , ZnSO ₄ , CaSO ₄ .
PM _{2.5}	xPbO.PbSO₄ x=(1,2,3), α-PbO, PbSO₄, Na₂SO₄ , ZnSO ₄ .

Raman microspectrometry (RMS) enables the investigation of individual particles. The scanning of a large area of sample (300 μm²) by automated analysis enables the detection of minor and major components of a high number of particles. In all sources xPbO.PbSO₄ (x=1,2,3), PbSO₄, α-PbO and Na₂SO₄ were identified as major species. A large number of particles in PM_{tot} samples were aggregates composed of lead sulfate wrapped up by Na₂SO₄. The RMS results were consistent with XRD, but RMS identified new species including PbCO₃ and Pb₃(CO₃)₂(OH)₂ in Furnace PM and Refining PM as secondary species, α-Fe₂O₃, CaSO₄ and FeOOH. As for XRD results, a larger variety of species was found in PM_{10/2.5} compared to PM_{tot}.

3.2.3.5 Potential availability of particles:

Results of extractions presented on Figure 24 show relative metals contents with respect to total lead concentrations in samples. CaCl₂ extractions were carried out on ten metals and metalloids. Regardless of the source of particles, the less exchangeable metal was Fe (< 0.001%) followed by Pb (<0.1%). Despite, this low rate of Pb extraction, lead was present at significant concentration (40 mg.l⁻¹) in extracted solution because of initial high contents. Concerning size influence, except for Sb, general trends show that percentages of exchangeable metal increased significantly when PM size decreases. For the *Emissions PM*, regardless of the size, the most exchangeable metal was Cd (up to 17% for PM_{2.5}) followed by Al, Mn, Ni and Zn.

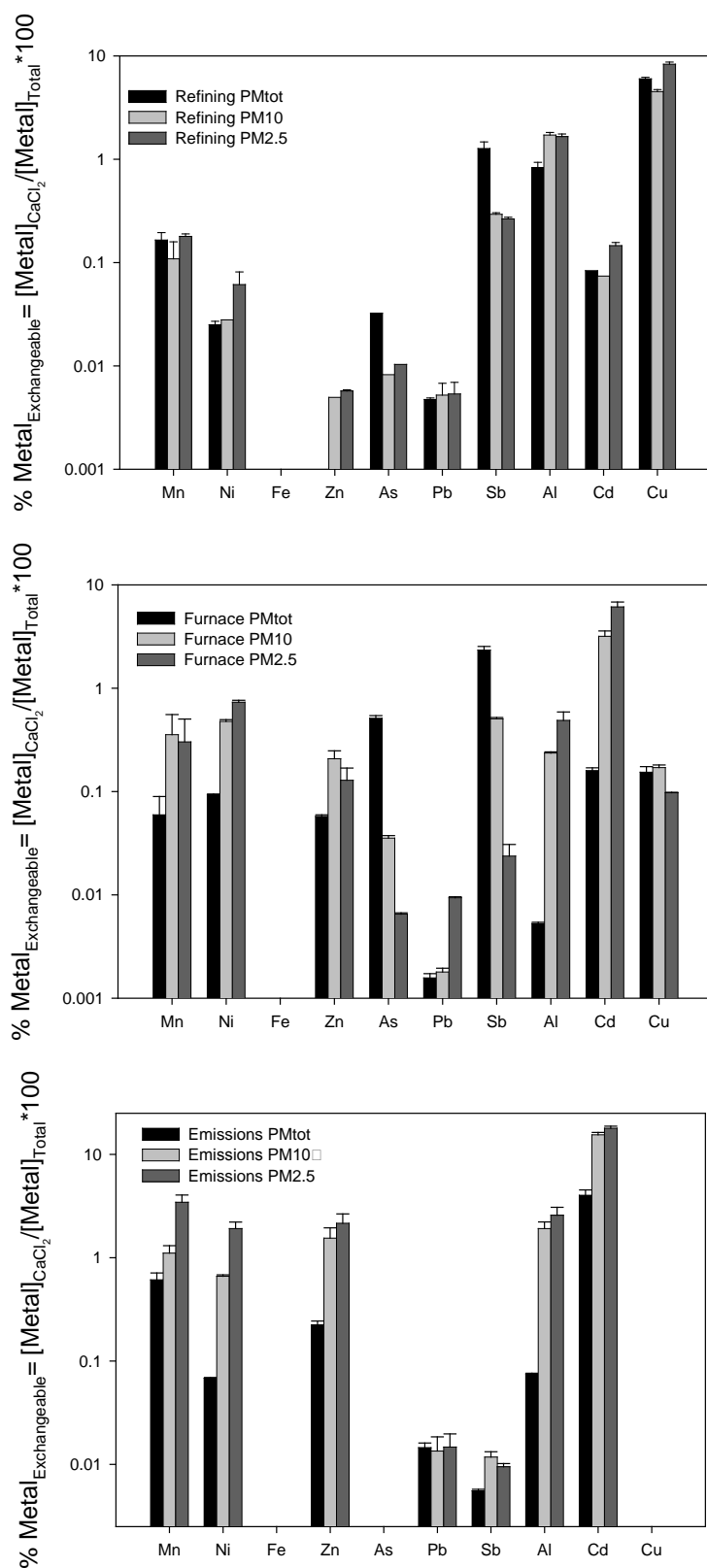


Figure 24 : CaCl_2 (0.01M) extraction. Results expressed as the percentage of the total particle Pb content.

Since no simple trend was observed between physico-chemical characteristics of particles and origin or size, therefore a chemical extraction test like CaCl_2 , a soft extractant appears to be a preliminary pertinent test that permits to discriminate the reactivity of particles in a simple way. CaCl_2 extraction is commonly used to assess availability of soil associated to metals and was adapted to particles. No single metal extraction is able to mimic the complex processes involved in metal dissolution in aerosols or in soils. No study was found on PM extraction with CaCl_2 (0.01M). However studies on metallic PM deal propose a sequential extraction [37] where the first step uses neutral salts like MgCl_2 in Tessier protocol [38]. Fernandez et al. [39] have shown in urban aerosols that 25% of total atmospheric lead in Seville and 9% in Barcelona, were extracted by MgCl_2 (1M). The same extraction for Cd, led to 55% available in Seville and 76% in Barcelona, for Fe: 5 and 1% and for Cu: 24% and 21%. These values are higher than ours are, but extractant concentrations are multiplied by ten in the Tessier protocol (MgCl_2 (1M) vs CaCl_2 (0.01M)). But the same trends are observed concerning availability of elements: $\text{Cd} > \text{Cu} > \text{Pb} > \text{Fe}$. Another study concerning incinerated sludge ash [40], showed that exchangeable metals by MgCl_2 (1M) were not detectable for Cd, Cu, Pb and Fe despite high elemental contents (Pb: 2270 mg/kg, Cu: 2870 mg/kg) : Elements of industrial wastes should be poorly available in agreement with our mg/kg results.

The low availability of lead (<0.01%) is consistent with the fact that main lead species identified (PbS , PbSO_4 and PbO.PbSO_4) have low solubility. Recently, investigations about metal leaching of PM from secondary lead smelter [41], showed that only primary alkaline sulfates and chlorides ($\text{Na}_3\text{Pb}_2(\text{SO}_4)_3\text{Cl}$ and $\text{KCl}\cdot 2\text{PbCl}_2$) were dissolved leading to the formation of anglesite (PbSO_4) as their final and stable alteration product. In this study, alkaline sulphates and chloride are minor speciations and anglesite is a major speciation. It could explain low lead availability.

Finally, elements that are the most available are secondary contents: Cd, Cu, Zn, Sb. As a prospect, it would be interesting to identify secondary speciations to link speciation and bioavailability.

3.2.4 Conclusions and prospects.

In the context of lead-recycling batteries our study demonstrated that differences in metal amounts and speciations throughout size fractions of various working places exist for the various PM. These differences could modify their reactivity.

However, general trends could not be determined and these differences were secondary in comparison with size proportions and morphology. Despite particles being relatively similar in composition, their structural differences may influence their reactivity. These different shapes mean sterical effects and differences in structural cohesion involving solubility and diffusion differences. That is why particles with shape in polyhedron or balls could exhibit different reactivity towards biosphere or human.

Preliminary results of reactivity obtained with CaCl_2 extraction demonstrated differences between the various particles tested. However It will be necessary to assess (eco)toxicity of theses PM to determine their potential consequences on humans and ecosystems.

3.2.5 Acknowledgements

ADEME, the French Agency for Environment and Energy as well as the STCM, are acknowledged for their financial support and technical help. This research project was supported by the National CNRS CYTRIX-EC2CO program.

3.2.6 Bibliography

- [1] U.S. GEOLOGICAL SURVEY, www.usgs.gov/, (2008).
- [2] CITEPA, CITEPA, <http://www.citepa.org/>, (2009).
- [3] USEPA, Lead; *Identification of dangerous levels of lead: FinalRule.*, 2001.
- [4] V. Ettler, Z. Johan, A. Baronnet, F. Jankovsky, C. Gilles, M. Mihaljevič, et al., *Mineralogy of Air-Pollution-Control Residues from a Secondary Lead Smelter: Environmental Implications*, *Environmental Science & Technology*. 39 (2005) 9309-9316.
- [5] K. Karita, T. Shinozaki, K. Tomita, E. Yano, *Possible oral lead intake via contaminated facial skin*, *Science of The Total Environment*. 199 (1997) 125-131.
- [6] B. Brunekreef, R.L. Maynard, *A note on the 2008 EU standards for particulate matter*, *Atmospheric Environment*. 42 (2008) 6425-6430.
- [7] M.L. Sammut, Y. Noack, J. Rose, *Zinc speciation in steel plant atmospheric emissions: A multi-technical approach*, *Journal of Geochemical Exploration*. 88 (2006) 239-242.
- [8] A.J. Fernandez Espinosa, M. Ternerero Rodriguez, F.J. Barragan de la Rosa, J.C. Jimenez Sanchez, *A chemical speciation of trace metals for fine urban particles*, *Atmospheric Environment*. 36 (2002) 773-780.
- [9] U.E.P.A. EPA, *Particulate Matter (PM_{2.5}) Speciation Guidance.Final Draft, Edition 1.Monitoring and Quality Assurance Group. Emissions, Monitoring and Analysis Division. Office of Air Quality Planning and Standards.*, 1999.
- [10] M.V. Ruby, A. Davis, R. Schoof, S. Eberle, C.M. Sellstone, *Estimation of Lead and Arsenic Bioavailability Using a Physiologically Based Extraction Test*, *Environmental Science & Technology*. 30 (1996) 422-430.
- [11] G. Uzu, S. Sobanska, Y. Aliouane, P. Pradere, C. Dumat, *Study of lead phytoavailability for atmospheric industrial micronic and sub-micronic particles in relation with lead speciation*, *Environmental Pollution*. 157 (2009) 1178-1185.
- [12] R.(U.O.N.Y. Lilis, A. Fischbein, J. Eisinger, *Prevalence of lead disease among secondary lead smelter workers and biological indicators of lead exposure*, 1977.
- [13] T.M. Roberts, T.C. Hutchinson, J. Paciga, A. Chattopadhyay, R.E. Jervis, J. Vanloon, et al., *Lead Contamination around Secondary Smelters: Estimation of Dispersal and Accumulation by Humans*, *Science*. 186 (1974) 1120-1123.
- [14] J. Rieuwerts, M. Farago, *Heavy metal pollution in the vicinity of a secondary lead smelter in the Czech Republic*, *Applied Geochemistry*. 11 17-23.
- [15] T.M. Spear, M.A. Werner, J. Bootland, A. Harbour, E.P. Murray, R. Rossi, et al., *Comparison of Methods for Personal Sampling of Inhalable and Total Lead and Cadmium-Containing Aerosols in a Primary Lead Smelter*, *American Industrial Hygiene Association Journal*. 58 (1997) 893.
- [16] P.B. Hammond, S.I. Lerner, P.S. Gartside, I.B. Hanenson, S.B. Roda, E.C. Foulkes, et al., *Relationship of biological indices of lead exposure to the health status of workers in a secondary lead smelter*, 1980.
- [17] S. Sobanska, N. Ricq, A. Laboudigue, R. Guillermo, C. Bremard, J. Laureyns, et al., *Microchemical Investigations of Dust Emitted by a Lead Smelter*, *Environmental Science & Technology*. 33 (1999) 1334-1339.
- [18] M.V. Ruby, A. Davis, J.H. Kempton, J.W. Drexler, P.D. Bergstrom, *Lead Bioavailability - Dissolution Kinetics under Simulated Gastric Conditions*, *Environmental Science & Technology*. 26 (1992) 1242-1248.
- [19] V.J.G. Houba, I. Novozamsky, T.M. Lexmond, J.J. van der Lee, *Applicability of 0.01 M CaCl₂ as a single extraction solution for the assessment of the nutrient status of soils and other diagnostic purposes*, *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 21 (1990) 2281.
- [20] Y. Batonneau, C. Bremard, L. Gengembre, J. Laureyns, A. Le Maguer, D. Le Maguer, et al., *Speciation of PM₁₀ Sources of Airborne Nonferrous Metals within the 3-km Zone of Lead/Zinc Smelters*, *Environmental Science & Technology*. 38 (2004) 5281-5289.

- [21] M. Sammut, Spéciation du cadmium, du plomb et du zinc dans les poussières d'émissions atmosphériques d'origine sidérurgique. Approche de l'impact toxicologique des poussières., CEREGE - UMR 6635 CNRS, Université AM III, 2007.
- [22] Y. Batonneau, C. Bremard, J. Laureyns, J. C. Merlin, Microscopic and imaging Raman scattering study of PbS and its photo-oxidation products, *Journal of Raman Spectroscopy*. 31 (2000) 1113-1119.
- [23] N.W. Menzies, M.J. Donn, P.M. Kopittke, Evaluation of extractants for estimation of the phytoavailable trace metals in soils, *Environmental Pollution*. 145 (2007) 121-130.
- [24] E. Meers, R. Samson, F.M.G. Tack, A. Ruttens, M. Vandegehuchte, J. Vangronsveld, et al., Phytoavailability assessment of heavy metals in soils by single extractions and accumulation by *Phaseolus vulgaris*, *Environmental and Experimental Botany*. 60 (2007) 385-396.
- [25] C. Monn, S. Becker, Cytotoxicity and Induction of Proinflammatory Cytokines from Human Monocytes Exposed to Fine (PM^{2.5}) and Coarse..., *Toxicology and Applied Pharmacology*. 155 (1999) 245-252.
- [26] Y.J. Zhu, N. Olson, T.P. Beebe, Surface chemical characterization of 2.5- μ m particulates (PM_{2.5}) from air pollution in salt lake city using TOF-SIMS, XPS, and FTIR, *Environmental Science & Technology*. 35 (2001) 3113-3121.
- [27] I.I. Fasfous, T. Yapici, J. Murimboh, N.M. Hassan, C.L. Chakrabarti, M.H. Back, et al., Kinetics of Trace Metal Competition in the Freshwater Environment: Some Fundamental Characteristics, *Environmental Science & Technology*. 38 (2004) 4979-4986.
- [28] D.C.W. Tsang, T.C.M. Yip, I.M.C. Lo, Kinetic Interactions of EDDS with Soils. 2. Metal-EDDS Complexes in Uncontaminated and Metal-Contaminated Soils, *Environmental Science & Technology*. 43 (2009) 837-842.
- [29] F. Abdul-Samad, J. Thomas, P. William, Chemistry of formation of lanarkite, Pb₂OSO₄, *Mineralogical Magazine*. (1982) 499-501.
- [30] CHESSE, pas de date.
- [31] M. Choel, K. Deboudt, P. Flament, G. Lecornet, E. Perdrix, S. Sobanska, Fast evolution of tropospheric Pb- and Zn-rich particles in the vicinity of a lead smelter, *Atmospheric Environment*. 40 (2006) 4439-4449.
- [32] P. Bataillard, P. Cambier, C. Picot, Short-term transformations of lead and cadmium compounds in soil after contamination, *European Journal of Soil Science*. 54 (2003) 365-376.
- [33] C.Y. Hwang, Size and shape of airborne asbestos fibres in mines and mills., *Br J Ind Med*. 40 (1983) 273-279.
- [34] V. Timbrell, Deposition and retention of fibres in the human lung, *Ann Occup Hyg*. 26 (1982) 347-369.
- [35] L.(D.S.O.P. Illum, S.S.U.(D.O.P. Davis, C.G. Wilson, N.W. Thomas, M. Frier, J.G.M.C. Hardy, Blood clearance and organ deposition of intravenously-administered colloidal particles. The effects of particle size, nature and shape, 1982.
- [36] Y. Geng, P. Dalhaimer, S. Cai, R. Tsai, M. Tewari, T. Minko, et al., Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery, (2007).
- [37] P. Smichowski, G. Polla, Dario Gomez, Metal fractionation of atmospheric aerosols via sequential chemical extraction: a review, *Anal Bioanal Chem*. 381 (2004) 302-316.
- [38] A. Tessier, P.G.C. Campbell, M. Bisson, Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals, *Analytical Chemistry*. 51 (1979) 844-851.
- [39] A.J. Fernandez, M. Ternero, F.J. Barragan, J.C. Jimenez, An approach to characterization of sources of urban airborne particles through heavy metal speciation, *Chemosphere - Global Change Science*. 2 (2000) 123-136.
- [40] J.L. Fraser, K.R. Lum, Notes. Availability of elements of environmental importance in incinerated sludge ash, *Environmental Science & Technology*. 17 (1983) 52-54.
- [41] V. Ettlér, O. Šebek, T. Grygar, M. Klementová, P. Bezdička, H. Slavíková, Controls on Metal Leaching from Secondary Pb Smelter Air-Pollution-Control Residues, *Environmental Science & Technology*. 42 (2008) 7878-7884.

Chapitre 4

Transfert du plomb issu des
particules vers les végétaux

4.1. Transfert sol-plante

4.1.1 Avant propos

Le chapitre précédent traitait de la caractérisation chimique des particules sources émises par le procédé de recyclage du plomb. Trois sources principales ont été dénombrées : les émissions canalisées des fours et les émissions diffuses des ateliers des fours et de l'affinage. Les particules de ces postes diffèrent par :

Leur morphologie : forme sphérique pour les émissions canalisées et formes irrégulières pour les particules des émissions diffuses dans les ateliers.

Leur taille : 75% des particules des émissions canalisées, 17% des particules de l'ambiance de l'affinage et 25% des particules des ambiances des fours sont inférieures à 10 μm (fraction inhalable).

Les spéciations majoritaires identifiées sont :

Emissions canalisées : 44% $\text{PbO}\cdot\text{PbSO}_4$ + 30% αPbO + 16% $\text{Pb}\cdot\text{FeOOH}$ + 14% βPbO selon EXAFS. Pb^0 , PbS , PbSO_4 , $\text{PbO}\cdot\text{PbSO}_4$, PbO , Na_2SO_4 , CdS selon DRX+ μRaman

Emissions diffuses des fours et affinage : PbS , PbSO_4 , $\text{PbO}\cdot\text{PbSO}_4$, PbO , Na_2SO_4 , (selon DRX+ μRaman).

La caractérisation physico-chimique des particules ainsi déterminée, nous permet d'étudier plus en avant la réactivité des émissions vis-à-vis d'un organisme cible : les végétaux.

Le deuxième objectif de cette étude vise à étudier l'influence de la taille particules riches en plomb sur le transfert sol-plante.

Des expériences ont été menées avec un dispositif de micro-cultures qui permet d'obtenir séparément les feuilles et les racines de végétaux non souillées ainsi que du sol considéré comme rhizosphérique. L'objectif était de déterminer si la culture de végétaux sur un sol contaminé artificiellement avec des particules de différentes tailles (PM_{10} , $\text{PM}_{2.5}$) a un impact sur les quantités de métaux transférées et de regarder les effets sur la croissance.

Il s'agissait également de comparer ces quantités de métaux transférées dans les laitues à celles extraites au CaCl_2 sur le même sol (un extractant doux adapté aux cultures exigeantes comme la laitue).

4.1.2 Study of lead phytoavailability for atmospheric industrial micronic and submicronic particles in relation with lead speciation.

G. Uzu^a, S. Sobanska^b, Y. Aliouane^a, P. Pradere^c and C. Dumat^{a*}

a-EcoLab UMR 5245 CNRS-INPT-UPS, ENSAT BP 32607 Auzeville Tolosane, 31326 Castanet Tolosan, France.

b-LASIR UMR 8516 - Université des Sciences et Technologies de Lille - Bâtiment C5 - 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

c-Chemical Metal Treatment Company, STCM, 30-32 chemin de Fondeyre, 31200 Toulouse, France.

* Corresponding author: Camille Dumat. Tel.: 335 62 19 39 03; fax: 335 62 19 39 01. E-mail address: camille.dumat@ensat.fr.

gaelle.uzu@ensat.fr; Sophie.Sobanska@univ-lille1.fr; p.pradere@stcmetaux.com;

4.1.2.1 Capsule

The soil-lettuce lead transfer from atmospheric industrial sub-micronic and micronic particles depends on particle size.

4.1.2.2 Abstract

Particles from channelled emissions of a battery recycling facility were size-segregated and investigated to correlate their speciation and morphology with their transfer towards lettuce. Microculture experiments carried out with various calcareous soils spiked with micronic and submicronic particles ($1650 \pm 20 \text{ mgPb.kg}^{-1}$) highlighted a greater transfer in soils mixed with the finest particles. According to XRD and Raman spectroscopy results, the two fractions presented differences in the amount of minor lead compounds like carbonates, but their speciation was quite similar, in decreasing order of abundance: PbS, PbSO₄, PbSO₄.PbO, α -PbO and Pb⁰. Morphology investigations revealed that PM_{2.5} (i.e. Particulate Matter 2.5 composed of particles suspended in air with aerodynamic diameters of 2.5 micrometers or less) contained many Pb nano balls and nano crystals which could influence lead

availability. The soil-plant transfer of lead was mainly influenced by size and was very well estimated by 0.01M CaCl₂ extraction.

Keywords: lead, PM_{2.5} and PM₁₀, soil-lettuce transfer, phytoavailability.

4.1.2.3 Introduction

Due to its numerous past and present uses and high persistence, lead is a major environmental contaminant (Chen et al., 2006). Potentially toxic for living organisms even at low concentrations, lead constitutes a risk for humans who can absorb it in various ways (Canfield et al., 2003). In the context of contaminated gardens, elevated lead intake by humans can be due to the consumption of crop plants grown on soils with relatively high plant-available metal concentrations, ingestion of contaminated soil, either accidentally or intentionally (pica), inhalation of soil particles and drinking water with high soluble concentrations of metals (Alexander et al., 2006). The total quantities of lead emitted in the environment by industries have decreased sharply in recent decades (Glorennec et al., 2007) and are strictly controlled in Europe nowadays. Lead was recently classified as a substance of very high concern in the European REACH law (Regulation EC 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals). However, particles enriched with lead are still generated especially by lead-recycling plants (Batonneau et al., 2004; Ohmsen, 2001) and constitute the main source of lead pollution for soils (Miquel, 2001; Donisa et al., 2000).

According to Zhang et al. (2005), emitted particles present a large granulometric spectrum in the atmosphere, but during the last decade the proportion of fine particle matter (PM) increased with the use of more effective filters in industry. Indeed PM₁₀ are target species of the World Health Organization (WHO, 2001) and the European Union Framework Directive on ambient air quality assessment (EU, 1999), due to their adverse effects on the environment and human health. While micrometric and sub-micrometric fractions contribute very little to ambient particle mass, they may occur in substantial number concentrations. Most of the studies dealing with the characterization of metal-enriched particles in the ambient air provide information on quantitative measurements for PM₁₀ fractions (EU directives 96/62 and 99/30) and very few on the sub-micronic fraction (Lazaridis et al., 2002). The lack of knowledge regarding metal speciation in the industrial particles results mainly from a lack of analytical tools, both sensitive and specific to the size of the particles.

These fine particles are highly reactive due to their high specific area and can be transported over long distances in the troposphere (Barrie, 1992). They could therefore present a greater impact on the biosphere than coarse particles (Fernandez Espinosa, 2005). Ruby et al. (1992) concluded that the bioaccessibility of lead rises strongly in particles under 2.4 μm size. But, the phytoavailability of lead in industrial particles as a function of their size and speciation have not been studied yet. In comparison with zinc, lead generally shows a relatively low mobility in soils (Dumat et al., 2006). It can however migrate through the soil with dissolved organic matter (Cecchi et al., 2008) or be mobilized by certain plants (Arshad et al., 2008). Moreover, carried from the air to the soils as fine particles, lead could be released more easily in soil solution (Komarnicki, 2005).

We therefore focused our study on the links between soil-plant transfer of lead, size and speciation of particles emitted by a lead recycling plant, currently the main source of atmospheric emissions (Cecchi et al., 2008). The objectives were the following: (i) the elemental and molecular characterisation of micrometer and nanometer sized lead-rich particles and (ii) to study the influence of particle characteristics on lead soil-plant transfer.

The physico-chemical characterization of industrial PM_{10} and $\text{PM}_{2.5}$ particles collected in the plant was investigated using both bulk and micro analysis techniques: (i) MEB-EDS to determine the morphology and chemistry on the scale of a particle (Laskin et al., 2006; Choel et al., 2005); (ii) Raman microspectrometry to study particle speciation (Batonneau et al., 2004; 2006; Falgayrac et al., 2006; Sobanska et al., 2006). The transfer of lead from particles to the lettuce *Lactuca sativa* a widely grown garden vegetable was investigated in the laboratory: two different uncontaminated calcareous soils were spiked with PM_{10} and $\text{PM}_{2.5}$ for soil-plant experiments with a biotest device that enabled careful study of rhizosphere and roots in addition to the transfer to the shoots (Chaignon and Hinsinger, 2003). The study was finally completed by CaCl_2 extraction experiments carried out according to Houba et al. (1996) to estimate lead phyto-availability.

The hypothesis tested throughout all these experiments was that particle characteristics have a significant influence on lead soil-plant transfer and translocation.

4.1.2.4 Materials and methods

4.1.2.4.1 Particle sampling and size separation.

A secondary lead smelter which currently recycles batteries was chosen as a representative example of the smelter metal industry to develop a methodology aimed at the risk assessment of industrial lead particles. The plant of the Chemical Metal Treatment Company (STCM) is located in the urban area of Toulouse (43°38'12" N, 01°25'34" E). According to the French authorities (DRIRE, 2007), 328 kg of Total Suspended Particles (TSP) including 31 kg of lead were emitted by this factory in 2007.

Three sources of particles corresponding to the three work units involving different steps in the process are identified in the plant: (i) the battery grinding unit where battery components are separated under wet conditions (ii) the smelter where lead pastes are processed in rotary furnaces at 1200°C and finally (iii) the refinery where lead is purified from unwanted metals or enriched. The same process has been used for thirty years in the plant. This study focuses on channeled emissions only generated by the furnace unit, considering the transfer towards the biosphere. The particle collection, performed three months after complete cleaning of the three work units (March, 12, 2007), is therefore representative of that emission period. Our aim was to characterize the reactivity of the particles in relation with their previously determined speciation and size, not to follow one specific parameter over time.

1kg of particles was collected in polyethylene bags from the air-sleeve filters of the furnace, then sealed and transferred in sealed opaque containers for transport to the laboratory. Samples were passed through a 2-mm stainless steel AFNOR sieve. Process dust was stored in a cool (4°C) dark place with Merck desiccant.

Because 80 % of emitted particles were smaller than 10 µm, PM_{2.5} and PM₁₀ were size-segregated by artificial resuspension in a Teflon bag (Batonneau et al., 2004; Young et al. 2002) and collected by impaction onto a PM_{10/2.5} Dekati inertial impactor. The cascade impactor consists of two successive stages with aerodynamic cut-off diameters of 10 and 2.5 µm when it operates at 10 L/min airflow. PM₁₀ present an aerodynamic diameter between 2.5 and 10 µm, whereas the PM_{2.5} stage collects particles < 2.5µm.

4.1.2.4.2 Characterization of particles

Elemental total contents of the two size fractions were determined by ICP-OES (IRIS Intrepid II XDL) after heated digestion with standard acid (HNO₃, HCl and HF, Suprapur, Merk) in a PTFE vessel. Levels of C, H, S and O were determined after burning in an elemental analyser with coulometric-catharometric detection and IR.

X-ray diffraction patterns of PM₁₀ and PM_{2.5} were recorded on an INEL diffractometer equipped with a curved detector CPS 120 and Co (K α) radiation allowing a 120°/2 θ detection. Crystallized compounds were identified by comparison with the diffraction patterns of the JCPDS database. The relative abundance of each crystallized phase detected in samples was qualitatively estimated by using the relative intensity of the strongest X-ray pattern peaks of each considered phase. It should be noticed that only crystallized phases with an abundance superior to 5 % in weight can be detected by XRD.

Particles were characterized using complementary microscopy and imaging techniques to determine elementary and molecular composition, size, morphology and heterogeneity of the individual lead-rich particles.

X-ray elemental mapping and secondary images were obtained using an Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM) working in high-vacuum mode. The Quanta 200 FEI instrument was equipped with an energy-dispersive X-ray (EDX) detector. ESEM was operated at 10-25 kV. Particles were dispersed on carbon substrates and analysed without further preparation. Because of the ESEM configuration, light element detection (C, N, and O) was ambiguous.

Raman microspectrometric measurements were carried out with a LabRAM confocal spectrometer (Jobin Yvon, Horiba Gr, France). The spot size of the laser focused by a 100xobjective (numerical aperture (NA) = 0.90) was estimated to be 1 μm^2 in size. A liquid nitrogen-cooled CCD (Jobin-Yvon, 2048 pixels \times 512 pixels) was used for detection. The Raman backscattering was excited at 632.8 nm provided by an internal, air-cooled, linearly polarized helium-neon laser. The laser power delivered to the sample was 8 mW. The microscope stage was XY-motorized and computer-controlled for point by point scanning with 0.1 μm resolution, 1 μm reproducibility and 90 mm \times 60 mm spatial range. The glass plate with the impacted particles was mounted on the microscope stage without any further preparation. Data acquisition consisted in recording many spectra in point-by-point scanning mode with 1 μm as a minimum step, one accumulation and 30 s spectrum acquisition time. For

identification of Raman spectra the experimental spectra were compared to reference spectra using Spectral Library Search ID 301 software (Thermo Galactic).

4.1.2.4.3 Measure of soil-plant lead transfer performing microculture experiments

Lettuce was chosen because it is a common vegetable widely grown for human consumption and has recently been used by several authors for metal transfer studies (Khan et al., 2007; Waisberg et al., 2004; Alexander et al., 2006). Moreover, lettuce is often used around plants to estimate atmospheric pollution.

The biotest presented on Figure 25 was first described by Niebes et al. (1993) and then adapted by Chaignon and Hinsinger (2003). A small PVC cylinder (25 mm inner diameter) was closed by a polyamide net (900 μm mesh) inserted into a larger cylinder, itself closed by a finer polyamide mesh (30 μm , Fyltis/Nytel, Sefar filtration). A space of 3 mm was left between the net and the finer mesh, where the roots could develop as a mat.

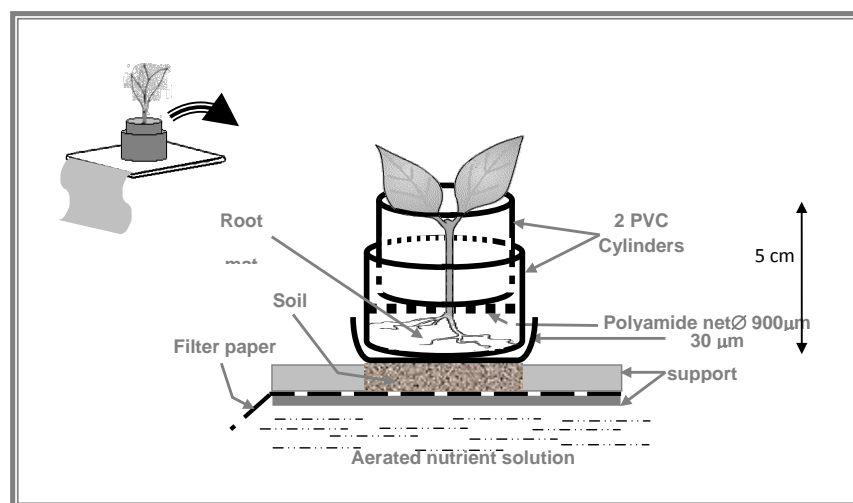


Figure 25 : Microculture device

Commercial lettuce seeds, “Batavia blonde dorée” cultivar, were surface sterilized with 0.9% CaClO for 15 min and rinsed with deionised water. Three seeds were sown in the container on the surface of the coarser mesh.

Lettuces were first grown hydroponically for 21 days to obtain a large flat mass of roots that fully covered the fine mesh.

The devices were placed on top of troughs containing an aerated complete nutrient solution with the macroelements: 5 mM KNO₃, 5 mM Ca(NO₃)₂, 2 mM KH₂PO₄ and 1.5 mM MgSO₄ and oligoelements: 9.11 μM MnSO₄, 1.53 μM ZnSO₄, 0.235 μM CuSO₄, 24.05 μM H₃BO₃, 0.1 μM Na₂MoO₄ and 268.6 μM Fe/EDTA. The height of the nutrient solution was adjusted daily to keep the fine mesh wet during the whole pre-culture period. The experiment was conducted in a growth chamber (temperature 24 ± 0.5 °C/18 ± 0.5 °C day/night cycles; photoperiod 16 h under daylight fluorescent lamps providing 400 μmol.m⁻².s⁻¹ [Philips 600W, Eindhoven, Netherlands] and 8 h darkness; relative humidity 70%).

Then, the second step involved an eight-day soil-plant contact period: five replicate plants for each treatment were transferred onto the various soil samples.

Top soils of two calcic cambisol profiles (FAO, 1998) produced by quaternary alluvial deposits, were sampled. These two calcareous soils (noted soil-1 and soil-2) with various physicochemical properties (Table 5) were chosen because that kind of soil happens to be observed around several battery recycling plants. Moreover, if the lettuce species could favor lead transfer, the choice of calcareous soils could reduce it. The soils differ by texture, soil cultivation, organic matter (OM) and CEC: soil-1 was uncultivated loamy-sandy clay with 2% of OM and soil-2 was sandy-clayey loam under sunflowers with 1% of OM and a higher CEC.

Table 5 :Physico-chemical characteristics of the two soils used for micro-culture experiments.

	unit	Soil-1	Soil-2
pH		8.3	8.4
CEC	cmol+/kg	19.9	8.9
Clay	(g.kg-1)	405	195
Silt		261	390
Sand		334	415
C/N		9.15	8.9
MO	(g.kg-1)	18.8	12.5
Total carbonates	(g.kg-1)	36.8	98
P2O5 Joret Hebert	(g.kg-1)	0.28	0.215
Cd (HF extraction)	(mg.kg-1)	0.22	0.175
Pb (HF)		35.5	21
Zn (HF)		101	48
Cu (HF)		28.5	31

These two soils were spiked with PM_{2.5} and PM₁₀ up to [Pb] = 1650 ± 20 mg.kg⁻¹.

60 mg of particles were added per box containing 10 g of soil and were agitated for a day. Soils were turned over every fifteen days for four months. This long period was chosen to allow time for natural equilibration of the various sorption mechanisms in the soil (Alexander et al., 2006).

The relatively high total lead soil concentration was chosen to be representative of a real soil pollution situation observed for atmospheric fallout from an STCM plant (Cecchi et al., 2008) and we wanted to be sure that enough lead was available for the plant in soil solution. Surveys of garden soils in several countries have shown wide ranges of concentrations of heavy metals. For example, Culbard et al. (1988) found concentrations of up to 14,100 mg Pb kg⁻¹. Some soils were left without crops, to determine the pH possible variation due to soil solution influence. During the growth, pH was measured daily and nutrient solution level was maintained constant. pH of nutrient solution was 5.5±0.3 during the hydroponic and soil contact phases.

This biotest device presents two main advantages: (i) the roots are physically separated from the soil which enables total recovery of the shoots, roots and soil; (ii) the thickness of the soil layer used enables it to be considered it as rhizosphere soil and provides enough rhizosphere material to evaluate root-induced changes in metal speciation.

Roots and aerial parts were collected and analysed separately after the soil plant contact period. Biomass was determined before oven-drying at 80°C for 48H. Lead bound to the outer root cell walls, called [Pb]_{adsorbed}, was determined according to the method of acidic desorption as described by Ferrand et al. (2006): roots were shaken end over end with 40mL of 0.001M HCl for 3 min, and then 360 µL of 1 M HCl was added to yield a final concentration of 0.01 M HCl. After shaking for another 5 min, the suspension was filtered through ashless paper. Then, plant roots and aerial parts were mineralized separately in a 1:1 mixture of HNO₃ and H₂O₂ at 80°C for 4h. After filtration, the major and trace element concentrations were determined with an IRIS Intrepid II XDL ICP-OES. The concentration in roots after mineralization is considered as uptaken lead ([Pb]_{roots}). The accuracy of the acidic digestion and analytical procedures was verified using the reference material Virginia tobacco leaves, CTA-VTL-2, ICHTJ.

4.1.2.4.4 Estimation of lead availability
by CaCl₂ extraction experiments

For the determination of the phytoavailable fraction, according to Menzies et al. (2007) neutral salts extractants provide the most useful indication. The 0.01 M CaCl₂ extraction procedure gives a good indication of lead phytoavailability (Meers et al., 2007).

The CaCl₂ procedure, first described by Houba, et al. (1996), was performed on the two contaminated soils and particle samples (PM₁₀ and PM_{2.5}). 30 mL of 0.01 M CaCl₂ solution was mixed with 3 g of soil (1:10 solid solution ratio) in 50ml polypropylene centrifugation tubes placed on a shaker table (Heidolph promax 1020) at 50 oscillations/min for 2h, 20°C. After extraction, the tubes were centrifuged at 10,000 g for 30 min (Avanti 30 centrifuge Beckman). The supernatant liquid was then filtered (0.22µm), acidified to 2% with distilled HNO₃ (15M, suprapur 99.9%) and stored at 4°C before analysis.

That CaCl₂ extraction procedure was performed on particles, reference soils, and the two spiked soils before and after culture. Extracted metal concentrations were determined by an IRIS Intrepid II XDL/ Thermo Electron Corporation model ICP-AES Calibration used reference materials (ion 915 from National Water Research Institute, Canada).

4.1.2.4.5 Statistical data treatment

The plant absorption and chemical extraction data obtained were subjected to analysis of variance (ANOVA) with one factor, using the software Statistica, Edition'98 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). For each bioassay, mean values with different letters represent a significant difference ($p < 0.05$) as measured by the LSD Fisher test. Letters are reported on the figures and tables.

4.1.2.5 3. Results

4.1.2.5.1 PM₁₀ and PM_{2.5}
characterization:

Elemental concentrations in particles are shown in Table 6. All results are given as the mean of the three replicates for each sample (PM₁₀ and PM_{2.5}) and standard deviations never exceed 7%. No significant difference except for Fe in the total

elemental concentrations was observed in relation with the size of the particle. Major elements found in the samples were, by mass: Pb (27%), O (15%) and S (7.5%) for both fractions. High levels of Na (3-4%) were due to the industrial recycling process where Na is used to lower the melting point of Pb. Several other metals: Cd (2.5%), Zn (0.5%), Fe (0.1-0.4%) and Sb (0.1%) are also present. The remaining elements to complete to 100% are expected to be chloride and other trace metals.

Table 6 : Total elemental analysis of particles.

Sample	Contents (mg.kg-1) ± 7%												
	Al	As	Cd	Cu	Fe	O	Na	Ni	Pb	Sb	Zn	S	C
PM 2,5	10	867	25243	480	1395	149300	31691	41	272834	1266	5194	78100	12100
PM10	52	841	23139	617	4010	150000	39697	97	267353	1361	5372	74300	11500

XRD patterns of PM₁₀ and PM_{2.5} provide identification of major crystallized species in bulk samples. The results are presented in Table 7. Particles are mainly composed of metallic sulfides, sulfates, oxides and perchlorates. A significant amount of Na₂SO₄ was found in PM₁₀ samples. Regardless of the size, the major phases identified were the same and one more Fe species was detected for PM_{2.5}.

Table 7 : Determination of main chemical speciation of lead in the PM10 and PM2.5 particles by X-Ray Powder Diffraction Analysis a

Sample	Cristallized compound	Estimated % of phases
PM10	PbS ,	55
	PbO.PbSO4, PbSO4, Pb(ClO4)2, Pb,	25
	Na2SO4	10
	CdS, Cd(ClO4)2, ZnO, ZnSO4	10
PM2,5	PbS ,	55
	PbO.PbSO4, PbSO4, Pb(ClO4)2, Pb,	25
	Na2SO4	10
	CdS, Cd(ClO4)2, ZnO, ZnSO4, FeS2	10

a The major compounds are written in bold

The ESEM-EDX analysis provided the morphology and elemental composition of individual particles in the two size fractions. PM₁₀ samples exhibited both particles with a size range between 2 and 10 µm and large aggregates composed of many micron-sized particles without specific shapes (Figure 26). The main elements detected by EDX in these aggregates were, by order of importance, Pb, S, Cl, Sn, Na, and Fe. The chemical complexity of aggregates did not allow the detection of minor

elements. Elemental mapping recorded on PM₁₀ showed the chemical heterogeneity of aggregates. PM_{2.5} samples are composed of fine aggregates of few submicronic particles exhibiting characteristic features i.e. needles (< 100 nm), nano crystals (< 500 nm), cubes (~300 nm) and balls (~500 nm). Elemental analysis of particles showed that needles mainly contain Pb and S, nano crystals are composed of Pb, S and Cl while Na and S are detected in cubic particles. Compared to the PM₁₀ sample, numerous Pb only-rich nanoballs were observed in PM_{2.5} (Figure 26).

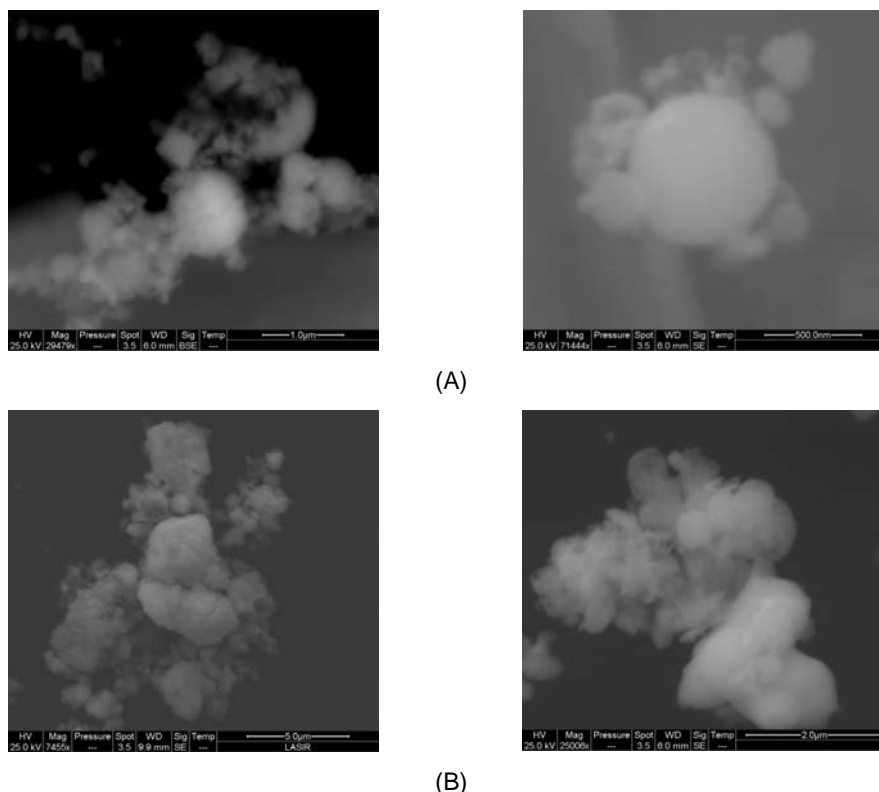


Figure 26: ESEM images of PM_{2.5} (A) and PM₁₀ (B).

Raman microspectrometry combines the analytical capability of Raman spectroscopy to distinguish *in situ* a wide range of chemical substances in aerosols with the spatial resolution of a confocal optical microscope ($\sim 1 \mu\text{m}^3$) which enables investigation of individual particles. The scanning of a large area of sample ($300 \mu\text{m}^2$) by automated analyses enables the analysis of a huge number of particles. The data treatment of all the spectra recorded in this area leads to the major and minor component identification. $x\text{PbO}\cdot\text{PbSO}_4$ ($x = 1,2,3$), PbSO_4 , $\alpha\text{-PbO}$, PbCO_3 , Na_2SO_4 , and ZnSO_4 were identified in both PM₁₀ and PM_{2.5} samples as major species. The laser-damaging effect generates complete and irreversible oxidation of PbS to PbSO_4 as described previously (Batonneau et al., 2000). The Raman mapping of species within particles exhibits a large heterogeneity of particle composition. A typical Raman

image of PM_{2.5} particles is shown in Figure 27. A large number of particles are composed of lead sulphate and are agglomerated with other compounds such as sodium sulphate or carbonates in both PM₁₀ and PM_{2.5} size fractions. The results suggest that no significant differences in lead speciation are observed in accordance with the particle size. However, for the minor lead compounds (like carbonates) not exactly quantified by XRD, differences in percentages between the two size fractions could exist.

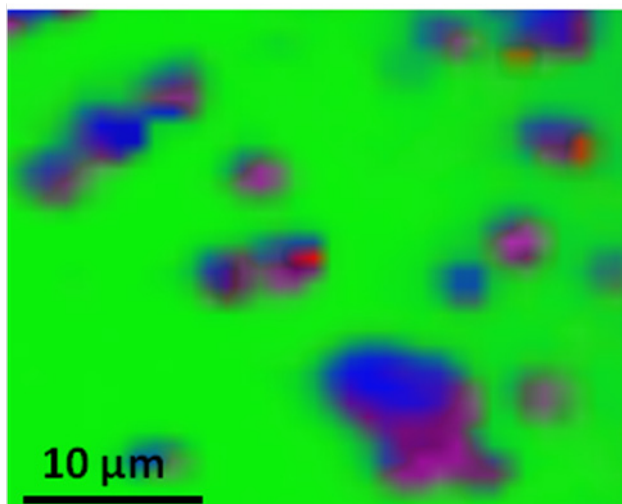


Figure 27 : Raman image of PM_{2.5} particles after a smoothing procedure. Blue 4PbO.PbSO₄, pink PbO.PbSO₄, red Na₂SO₄ and green substrate.

4.1.2.5.2 Assessment of the available fraction with CaCl₂ extraction

Figure 4A and 4B shows respectively total lead concentrations extracted by CaCl₂ and percentages of extracted lead with CaCl₂ (relative, with respect to total lead concentrations in different substrates) for various samples: the single particles, soil-1 and spiked soil-1 before and after an eight-day exposure of *Lactuca sativa*.

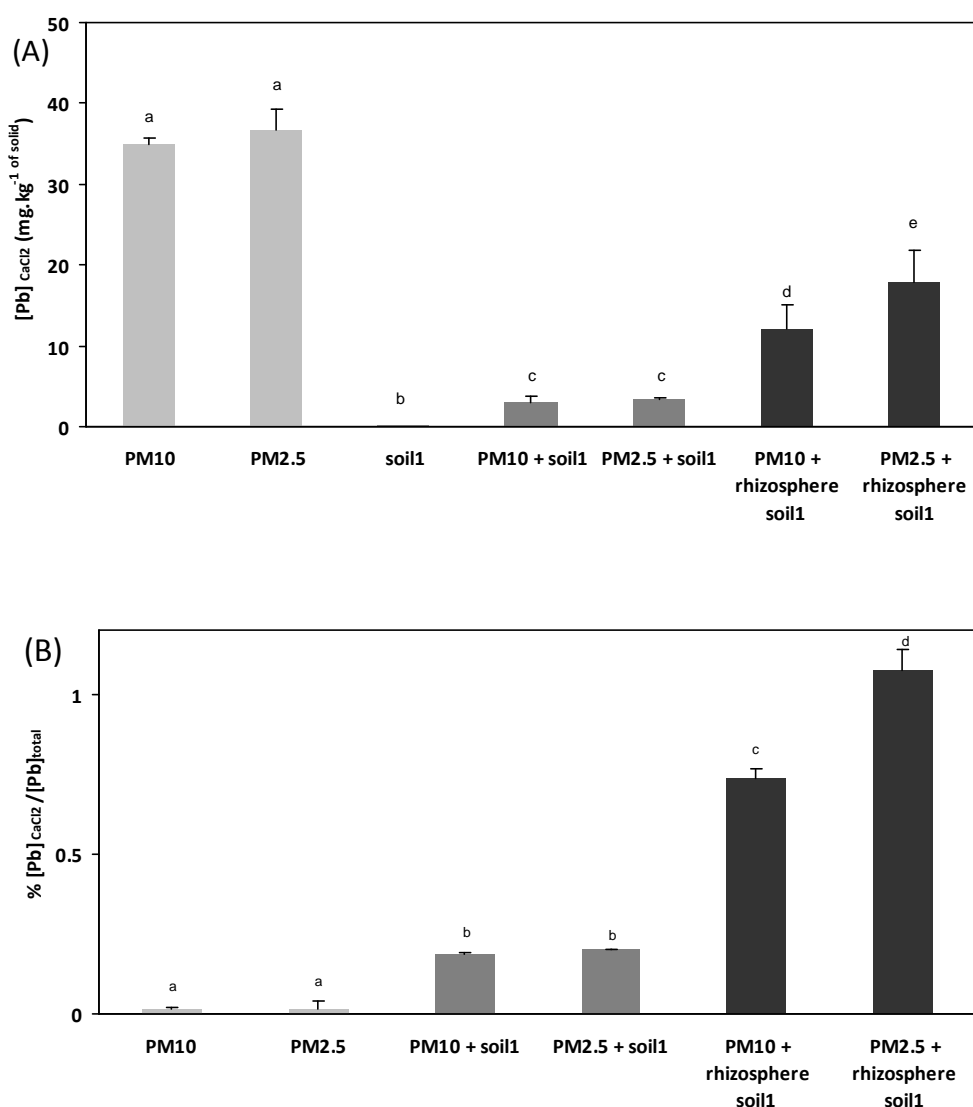


Figure 28 : Total contents (A) and relative contents (B) of lead extracted with CaCl₂ on particles (white), spiked soils with lead particles of different size before (grey) and after (black) a seven-days exposure of *Lactuca sativa*, n=5.

Due to high levels of lead in particles (330,000 mg.kg⁻¹), maximum lead quantities were extracted from PM₁₀ and PM_{2.5}. But, in comparison with total lead contents, lead in uncultivated spiked soils was 0.2% exchangeable, while PM_{10-2.5} presented a 0.01% exchangeability. Reference soils were under ICP-OES limit detection. After culture, a significantly greater lead quantity was extracted by CaCl₂ for the soil spiked with the finest PM_{2.5} fraction than in PM₁₀. A 1 unit pH decrease was measured after plant-soil contact while the pH values of the control soils (left without crops but with nutrient solution influence) remained constant. Concerning CaCl₂ extraction, no significant differences were observed between the two particle sizes in the PM_{10-2.5}

and spiked soil-1 before culture; The same trends described above for soil-1 were also observed for soil-2.

4.1.2.5.3 Influence of lead exposure on plant growth.

Fresh biomass data are shown in *Figure 29*. After eight days of soil-plant exposure, biomasses for aerial parts grown on spiked soils were slightly lower than in the respective unspiked soils. No significant biomass differences were observed among the two types of spiking ($PM_{10-2.5}$). In controls, fresh weights were approximately 18.5 ± 2.5 g for aerial parts and 3.7 ± 0.7 g for roots while in spiked soils, weights reached 12 ± 4 g and 2.5 ± 1 g respectively. This slight influence of lead on plant biomass could be due to lead toxicity (Sharma & Dubey, 2005) or water status (Parys et al., 1998).

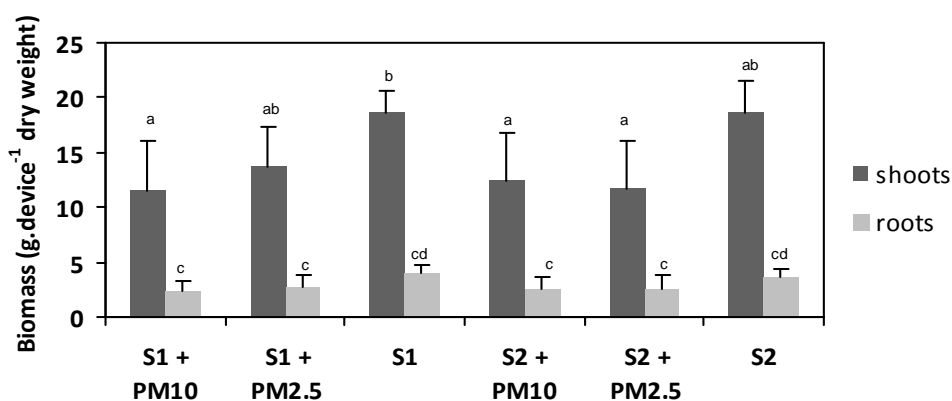
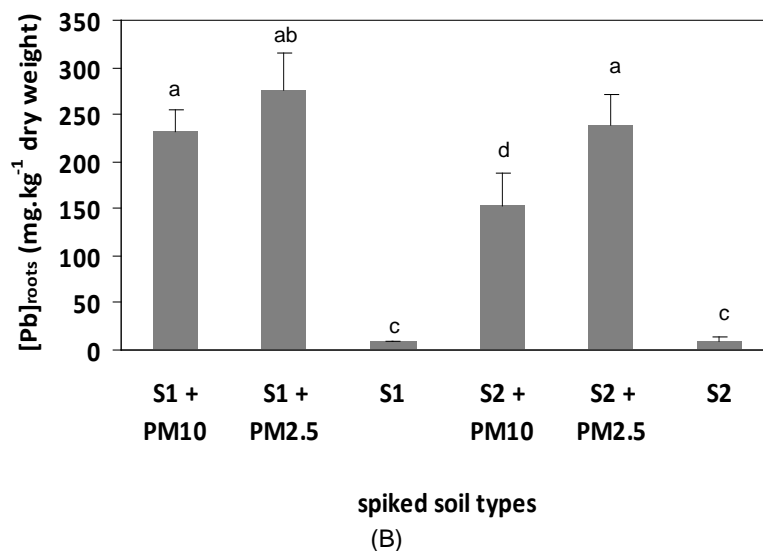
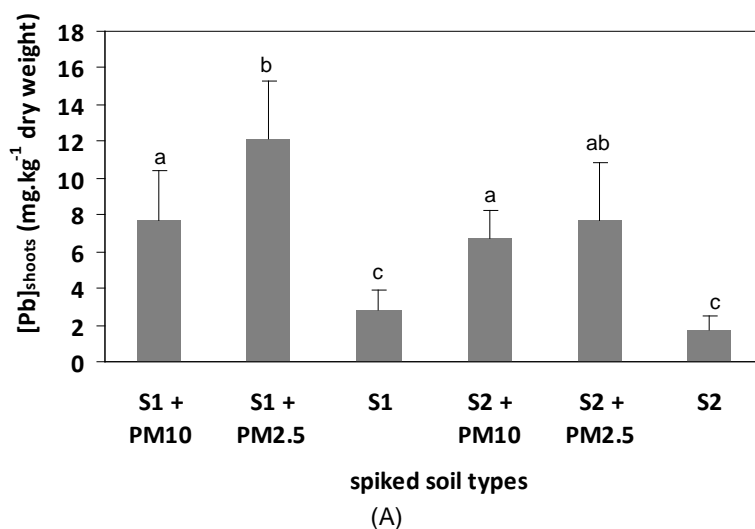


Figure 29 : Plant biomass data for aerial parts (black) and roots (grey). The error bars indicate the standard deviation while different letters show significant differences ($p < 0.05$) as measured by an LSD fisher test (one-factor ANOVA).

4.1.2.5.4 Absorption and adsorption of lead in the lettuce.

Figure 30 presents results of lead transfer from soil to the various compartments of the plant (roots and shoots) and the distribution between adsorption (noted $[Pb]_{adsorbed}$) and absorption for roots ($[Pb]_{roots}$) respectively described in the materials and method section as lead only adsorbed at the root surface and lead truly taken up by the plant. Measurements on the reference samples (Tobacco leaf VTL-2) validated the assay: the concentration found was 21.4 ± 1.1 $mg.kg^{-1}$, for a certified value of 22.1 ± 1.2 $mg.kg^{-1}$. Several trends were observed dealing with the influence of the particle type, soil type and lead location. For both soils, a significant increase of lead

adsorption on roots, absorption and translocation throughout the shoots was observed, when the finest particles were added in comparison with the PM₁₀. Global uptakes ($[Pb]_{adsorbed} + [Pb]_{roots} + [Pb]_{shoots}$) were greater for soil 1 than for soil 2. The main lead fraction was adsorbed on root membranes where concentrations were up to $985 \pm 147 \text{ mg.kg}^{-1}$ for PM₁₀ contaminated soils and up to $1281 \pm 195 \text{ mg.kg}^{-1}$ for PM_{2.5} contaminated soils. The soils spiked with PM₁₀ allowed a lead uptake of $230 \pm 24 \text{ mg.kg}^{-1}$ by roots and a translocation to aerial parts of $7.7 \pm 2.7 \text{ mg.kg}^{-1}$. While in the PM_{2.5} spiked soils, root and shoot concentrations reached $275 \pm 40 \text{ mg.kg}^{-1}$ and $12.19 \pm 3 \text{ mg.kg}^{-1}$ respectively.



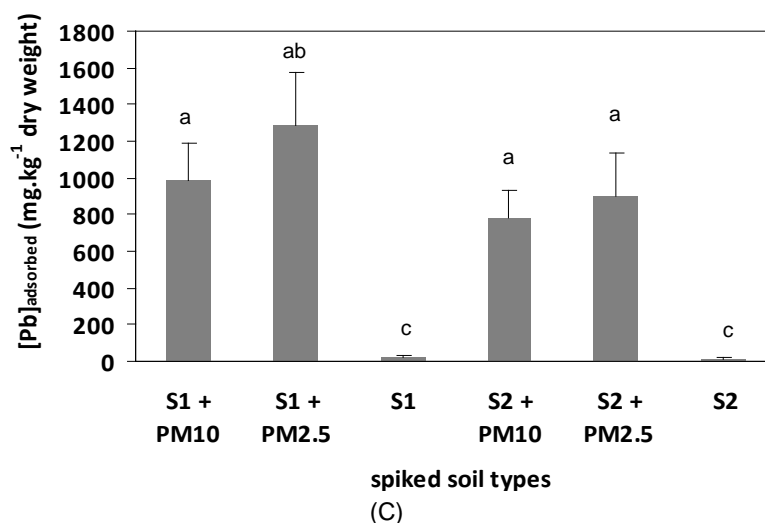


Figure 30 : Lead concentrations in different plant compartments: A: adsorbed onto roots, B: root uptake and C: translocated in shoots.

4.1.2.6 Discussion

4.1.2.6.1 Influence of particle size on soil-plant transfer and lead translocation.

Whatever the soil, for a given total lead concentration (1650 mg Pb.kg⁻¹ soil), higher lead soil-plant transfer and translocation were observed for the finest particles. Roots exposed to PM_{2.5} spiked soils allowed a 20% greater lead uptake and a 30% increase in adsorbed lead. Shoots presented a 60% increase in translocated lead in PM₁₀ spiked soils. For the first time in industrial particles, the transfer of lead to the soil solution and its translocation throughout the plant is reported to increase as the particle size decreases.

Douay et al. (2006), measuring lead concentrations in lettuces in urban gardens (1572 mg Pb.kg⁻¹) observed a shoot concentration of 5 mg Pb.kg⁻¹ DW. The soil to plant metal transfer measured in this study (for one week of lead exposure) was relatively high in comparison with previously reported data in publications dealing with vegetables (BAPPET, 2007), probably because of particle size, but also due to numerous factors that influence the soil-plant transfer of metals (Kabata-Pendias, 2004; Dumat et al., 2001 & 2006; Costa & Morel, 1993; Oliver et al., 1994).

Root transfer factors (TF-roots) and shoot transfer factors (TF-shoots) were calculated as ratios between [Pb]_{roots}, [Pb]_{shoots} with [Pb]_{soil}. TFr ranged from 0.10 to

0.17 and TFs were between 0.005 and 0.007 (Table 8). These relatively low values illustrate the known low mobility and availability of lead and are comparable to Khan et al.'s results (2008) reporting 0.15 for TFr and 0.07 for TFs. As transfer factors for vegetables decrease with increasing levels of lead in the soil (Zheng et al., 2007; Wang et al., 2006), we therefore expected a greater influence of particle size on transfer with a lower total lead concentration in soil.

Table 8 : Transfer factors in roots (TFr) and shoots (TFs) and translocation ratios.

Soil	TFs	TFr	Translocation
S1 + PM10	0.005	0.14	0.03
S1 + PM2.5	0.007	0.17	0.04
S1	0.081	0.26	0.31
S2 + PM10	0.004	0.10	0.04
S2 + PM2.5	0.005	0.15	0.03
S2	0.01	0.44	0.18

According to Sobanska et al. (1999), lead smelter emissions contain PbS, PbSO₄, PbSO₄.PbO, Pb, α-PbO compounds and numerous nano balls were observed for PM_{2.5}. Dumat et al. (2001) and Cecchi et al. (2008) working on soils polluted by lead produced by industrial atmospheric fallout from smelters, concluded that lead chemical speciation strongly influences its bioavailability. The sequence of solubility constants from the CHESS data base for the lead is the following: PbCO₃ > PbSO₄ > PbO > Pb⁰. In water media and equilibrium conditions, lead carbonate and sulphate will be much more labile than PbO or Pb⁰ species. However, according to Birkefeld et al. (2006 & 2007) which used an in-situ method to study dissolution and phase transformation of lead particles from a smelter in different soils, the sequence of solubility is strongly dependent on soil characteristics (like texture, pH, lime amount...). They observed that PbO was rapidly covered by lead-hydroxy carbonates (hydrocerussite) in some soils while in other it was relatively stable. Moreover, according to the general review of Ruby et al. (1992), release of lead in the soil solution depends on particle size, speciation and soil geochemistry. In soil solution, ligands like fulvic acids or low weight organic acids excreted by roots can displace the equilibrium (Ferrand et al., 2006). Finally, as no significant difference among speciation forms was noticed between PM₁₀ and PM_{2.5}, all changes observed in reactivity were attributed to size differences.

Whatever the particle size, greater lead absorption by lettuce was observed for soil-1 than for soil-2. In comparison with soil-2, soil-1 has more clay, its CEC is higher and its level of lime is lower (see Table 5). According to Twining et al. (2004), we could expect that lead transfer would be higher for soil-2. However, several hypotheses can explain the results observed: (i) the higher amount of carbonates present in the soil-2 could reduce lead absorption (Birkefeld et al., 2006 & 2007); (ii) the complex influence of soil organic matter on the transfer of metals (Yin et al., 2002; Inaba & Takenaka, 2005); (iii) for the total lead concentration studied, the relatively high quantity of lead could be available in the soil solution (due to high solubility of the fine particles) reducing the influence of soil characteristics.

Total lead in the roots ($[Pb]_{\text{roots}} + [Pb]_{\text{adsorbed}}$) reached 1500 mgPb/ kg dry weight. Lead in roots was predominantly adsorbed onto the cell walls, 80 % of the total lead in roots, and depends on the nature of the particles used for exposure: the uptake was greater for $PM_{2.5}$ than PM_{10} . According to Seregin et al. (2004), Pb^{2+} binds to the carboxy groups at the root surface reducing the translocation rate of lead (Pendergrass et al., 2006; Piechalak et al., 2002). To illustrate this phenomenon, the translocation factors or shoot/root ratios calculated indicate the ability of plants to transport metals from the roots toward the aerial parts (Ferrand et al., 2006): they ranged between 0.03 and 0.04 (Table 8). But considering the lower biomasses in roots than in shoots, we can also reason with lead quantities. Whatever the type of soil or spiking, the total lead quantity in shoots ($Pb_{\text{shoots}} \times \text{dry weight}$) between 0.003 and 0.007 mg Pb translocated which represents up to 33% ($PM_{2.5}$) of the total lead uptake. This percentage is not negligible with respect to risks concerning consumption of vegetables.

4.1.2.6.2 Behaviour of lead in the rhizosphere and assessment of lead availability.

Relatively high lead transfer was observed for the lettuce cultivated on the two alkaline spiked calcareous soils. $PM_{10-2.5}$ can therefore release lead in particular in the rhizosphere of *Lactuca sativa*. The lead availability estimated by the $CaCl_2$ procedure was greater for soils spiked with the finest particles and for both soils it increased after soil-plant contact: $[Pb]_{CaCl_2}$ in spiked soil with $PM_{2.5} > [Pb]_{CaCl_2}$ in spiked soil with PM_{10} . Under the root activity influence, the $CaCl_2$ lead extracted from polluted soils increased and a one-unit pH decrease in soil was measured. Lin et al. (2004) and Kidd and Monterroso (2005) also observed that exchangeable lead was much higher in the rhizosphere than in the bulk soil. Producing exudates, plants can

modify metal speciation and behaviour in the rhizosphere (Lin et al., 2004; Laperche, 1997; Welch, 1995).

This phenomenon has been particularly observed for calcareous soil by Chaignon and Hinsinger (2003). As pH influences metal solubility and transfer (Wang et al., 2006), the rhizosphere acidification could have displaced the equilibrium towards bicarbonates, which are less stable than carbonates (Sauvé et al., 1998). An effect of soil on particle solubility was also observed: particles present a CaCl_2 exchangeability ten times lower than in spiked soil. Quantities extracted for particles were only up to 1.5% of the solution extraction. Mixed with soil for four months, particle solubility could therefore have changed.

In order to estimate the transfer of lead from polluted soils towards lettuce, relationships were sought between: lead mobilised by CaCl_2 extraction performed on soils before culture and lead concentrations in lettuce (shoots and roots).

Equations were obtained from 6 parameters (2 soils; uncontaminated, spiked with PM_{10} or $\text{PM}_{2.5}$), and every condition was studied by 5 replicates finally involving 30 observations. Significant correlations were observed between lead concentrations in shoots (Equation 1 below, with $r^2 = 0.8$) or in roots (Equation 2 below, with $r^2 = 0.9$) and lead extracted by CaCl_2 .

$$\text{Equation 1: } [\text{Pb}]_{\text{shoots}} = 2.11 \times [\text{Pb}]_{\text{CaCl}_2} + 2.13, r^2 = 0.797, p < 0.01, n = 30$$

$$\text{Equation 2: } [\text{Pb}]_{\text{roots}} = 35.02 \times [\text{Pb}]_{\text{CaCl}_2} + 4.24, r^2 = 0.915, p < 0.005, n = 30$$

Both for PM_{10} and $\text{PM}_{2.5}$, the CaCl_2 chemical extraction was therefore a good indicator of soil-plant transfer. As previously shown by Pueyo et al. (2004), the 0.01 mol l^{-1} CaCl_2 extraction procedure seems to be a suitable method for the determination of phytoavailable lead. This test simplifies the matrix and could avoid *in vivo* tests.

4.1.2.7 Conclusions and perspectives

A significant size influence was found for soil-plant lead transfer and translocation throughout the lettuce when micronic and nanometric industrial particles were compared: roots exposed to $\text{PM}_{2.5}$ spiked soils allowed a 20% greater lead uptake and a 30% increase in adsorbed lead. Shoots presented a 60% increase in

translocated lead in PM₁₀ spiked soils. Our results highlight that source characteristics strongly influence metal transfer: total metal soil concentration is insufficient to estimate the risk induced by soils polluted by metals. Lead speciation was quite similar in PM₁₀ and PM_{2.5} particles i.e. PbS, PbO.PbSO₄, PbO, PbCO₃ and Pb⁰, were predominant however differences could exist for minor lead components. Moreover, the high amount of Pb-rich nano balls and nano crystals much more dispersed for PM_{2.5} could influence the lead transfer in the rhizosphere acidified by plant root activity. Lead concentrations in the edible part of lettuces were very well estimated by 0.01M CaCl₂ extraction.

In order to check the generality of the size influence of industrial particles on soil-plant transfer, further experiments could be performed on other vegetables and various soils testing aging effects. Moreover, the study of other metals and metalloids measured in the particles will be performed.

4.1.2.8 Acknowledgements.

ADEME, the French Agency for Environment and Energy as well as the STCM, are gratefully acknowledged for their financial support and technical help. This research project was supported by the National CNRS CYTRIX-EC2CO program. We thank Dr J. Silvestre from ENSAT for cropping advice, P. Recourt from *Laboratoire Geosystèmes*, UMR CNRS 8157, University of Lille for ESEM-EDX measurements and J. Laureyns from LASIR UMR CNRS 8516, for Raman Microspectrometry assistance. Finally, Dr P. Winterton from UPS is acknowledged for English review.

4.1.2.9 References.

- Alexander, P. D., Alloway, B. J. & Dourado, A. M., 2006. Genotypic variations in the accumulation of Cd, Cu, Pb and Zn exhibited by six commonly grown vegetables. *Environmental Pollution* 144(3), 736-745.
- Arshad, M., Silvestre, J., Pinelli, E., Kallerhoff, J., Kaemmerer, M., Shahid, M., Pradere, P. & Dumat, C., 2008. A field study of lead phytoextraction by various scented *Pelargonium* cultivars. *Chemosphere* 71, 2187–2192.
- Bahemuka, T. E. & Mubofu, E.B., 1999. Heavy metals in edible green vegetables grown along the sites of the Sinza and Msimbazi rivers in Dar es Salaam, Tanzania. *Food Chemistry* 66(1), 63-66.
- BAPPET –Database on ETM in vegetables. ADEME, INERIS, CNAM, INP, ENSAT, ISA.2008.<http://www.sitespollues.ecologie.gouv.fr/DocumentsDiagnostics.asp#BAPPET>.
- Barrie, L. A., 1992. Scavenging Ratios: Black Magic or Useful Scientific Tool?, in S. E. Schwartz and W. G. N. Slinn (eds), *Precipitation Scavenging and Atmosphere-Surface Exchange, Volume 1*, Hemisphere Publishing Corporation, Washington.
- Batonneau Y., Brémard, C., Gengembre, L., Laureyns, J., Le Maguer, A., Le Maguer, D., Perdrix, E., and Sobanska S., 2004. Speciation of PM₁₀ sources of airborne nonferrous metals within the 3-km zone of lead/zinc smelters. *Environ. Sci. Technol.* 38, 5281-5289.
- Batonneau, Y., Sobanska, S., Laureyns, J., Brémard, C., 2006. Confocal microprobe raman imaging of urban tropospheric aerosol particles. *Environ. Sci. Technol.* 40, 1300-1306.
- Batonneau, Y., Brémard, C., Laureyns, J. Merlin, J.C., 2000. Microscopic and imaging Raman scattering study of PbS and its photo-oxidation products. *Journal of Raman Spectroscopy* 31, 1113-1119.
- Birkefeld, A., Schulin, R., Nowack, B., 2007. In situ transformations of fine lead oxide particles in different soils. *Environ. Pollut.* 145: 554-561.
- Birkefeld, A., Schulin, R., Nowack, B., 2006. In situ investigation of dissolution of heavy metal containing mineral particles in an acidic forest soil. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 70: 2726-2736.
- Canfield, R.L., Henderson, C.R., Jr., Cory-Slechta, D.A., Cox, C., Jusko, T.A and Lanphear, B.P., 2003. Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 µg per deciliter. *N. Engl. J. Med.* 348, 1517-1526.
- Cecchi, M., Dumat, C., Alric, A., Felix-Faure, B., Pradere, P., Guisresse, M., 2008. Multi-metal contamination of a calcic cambisol by fallout from a lead-recycling plant. *Geoderma* 144, 287-298.
- Chaignon, V., Hinsinger, P., 2003. A biotest for evaluating copper bioavailability to plants in a contaminated soil. *J Environ Qual* 32, 824-833.
- Chen, Y., Wang, C., Wang, Z., 2005. Residues and source identification of persistent organic pollutants in farmland soils irrigated by effluents from biological treatment plants. *Environ. Int.* 31, 778–783.
- Choel, M.; Deboudt, K.; Osan, J.; Flament, P.; Van Grieken, R., 2005. quantitative determination of low-Z elements in single atmospheric particles on boron substrates by automated scanning electron microscopy-energy-dispersive X-ray Spectrometry *Anal. Chem.* 77(17), 5686-5692.
- Choël, M., Deboudt, K., Flament, P., Lecornet, G., Perdrix, E., Sobanska, S., 2006. Fast evolution of tropospheric Pb- and Zn-rich particles in the vicinity of a lead smelter. *Atmospheric Environment* 40, 4439-4449.
- Costa, G., Morel, J.L., 1993. Cadmium uptake by *Lupinus albus* (L.): cadmium excretion, a possible mechanism of cadmium tolerance. *Journal of plant nutrition (USA)* 16(10), 1921-1929.
- Culbard, E.B., Thornton, I., Watt, J., Wheatley, M., Moorcroft, S., Thompson, M., 1988. Metal contamination in British suburban dusts and soils. *Journal of Environmental Quality* 17, 226-234.

Donisa, C., Mocanu, R., Steinnes, E. And Vasu, A., 2000. Heavy Metal Pollution by Atmospheric Transport in Natural Soils from the Northern Part of Eastern Carpathians. *Water, Air, and Soil Pollution* 120(3-4), 347-358.

Douay, F., Pruvot, C., Mazzuca, M., Howsam, M., Fourrier, H., and De Saint Mahieu, A.L., 2005. Cadmium, lead and zinc concentrations in soil and vegetables from kitchen gardens in urban and highly-contaminated areas of northern France: evaluation of the risk of population exposure, *ConSoil 2005. Proceedings of the 9th International FZK/TNO Conference on Soil-Water Systems. Bordeaux, France (2005)*, 667-676.

DRIRE, Direction régionale pour l'Industrie, la Recherche et l'Environnement, <http://www.midi-pyrenees.driv.gouv.fr/>

Dumat, C., Chiquet, A., Gooddy, D., Aubry, E., Morin, G., Juillot, F., Benedetti, M.F., 2001. Metal ion geochemistry in smelter impacted soils and soil solutions. *Bulletin De La Societe Geologique De France* 172, 539-548.

Dumat, C., Quenea, K., Bermond, A., Toinen, S., Benedetti, M.F., 2006. Study of the trace metal ion influence on the turnover of soil organic matter in cultivated contaminated soils. *Environmental Pollution* 142, 521-529.

Ebert, M., Inerle-Hof, M. and Weinbruch, S., 2002. Environmental scanning electron microscopy as a new technique to determine the hygroscopic behaviour of individual aerosol particles. *Atmospheric Environment* 36, 5909-5916.

European Commission, 96/62/CE directive (September 27, 1996) for the quality of ambient air; directive 22/04/99 setting maximum levels for lead in ambient air; REACH directive Regulation (EC) No 1907/2006, Directive 67/548/EEC.

Falgayrac, G., Sobanska, S., Laureyns, J., Brémard, C., 2006. Heterogeneous chemistry between PbSO₄ and calcite microparticles using Raman microimaging. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 64, 1095-1101.

FAO, 1998. World reference base for soil research. *World Soil resources Report*, v. 84. FAO, Rome.

Fernandez Espinosa, A.J., Rossini Oliva, S., 2006. The composition and relationships between trace element levels in inhalable atmospheric particles (PM₁₀) and in leaves of Nerium oleander L. and Lantana camara L. *Chemosphere* 62, 1665-1672.

Ferrand, E., Dumat, C., Leclerc-Cessac, E., Benedetti, M.F., 2006. Phytoavailability of zirconium in relation to its initial added form and soil characteristics. *Plant and Soil* 287, 313-325.

Gloennec, P., Bemrah, N., Tard, A., Robin, A., Le Bot, B., Bard, D., 2007. Probabilistic modeling of young children's overall lead exposure in France: Integrated approach for various exposure media. *Environment International* 33, 937-945.

Houba, V.J.G., Lexmond, T.M., Novozamsky, I., van der Lee, J.J., 1996. State of the art and future developments in soil analysis for bioavailability assessment. *Science of The Total Environment* 178, 21-28.

Inaba, S., Takenaka, C., 2005. Effects of dissolved organic matter on toxicity and bioavailability of copper for lettuce sprouts. *Environment International*, 31, 603-608.

Kabata-Pendias, A., 2004. Soil-plant transfer of trace elements an environmental issue. *Geoderma* 122, 143-149.

Khan, S., Aijun, L., Zhang, S.Z., Hu, Q.H., Zhu, Y.G., 2008. Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals in lettuce grown in the soils contaminated with long-term wastewater irrigation. *Journal of Hazardous Materials* 152, 506-515.

Kidd, P.S., Monterroso, C., 2005. Metal extraction by *Alyssum serpyllifolium* ssp. *lusitanicum* on mine-spoil soils from Spain. *Science of The Total Environment* 336, 1-11.

Komarnicki, G.J.K., 2005. Lead and cadmium in indoor air and the urban environment. *Environmental Pollution* 136, 47-61.

Laperche, V., Logan, T.J., Gaddam, P., Traina, S.J., 1997. Effect of apatite amendments on plant uptake of lead from contaminated soil. *Environ. Sci. Technol.* 31, 2745-2753.

- Laskin, A., Cowin, J.P., Iedema, M.J., 2006. Analysis of individual environmental particles using modern methods of electron microscopy and X-ray microanalysis. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* 150, 260-274.
- Lazaridis M., Semb A., Larssen S., Hjellbrekke A.G., Hov O., Hanssen J.E., Schaug J., Torseth K., 2002. Long-range transport of aerosol particles and precursors - determining the relationship between emissions and observed concentration levels. *The science of the total environment* 285, 209-235.
- Lin, Q., Chen, Y.X., He, Y.F., Tian, G.M., 2004. Root-induced changes of lead availability in the rhizosphere of *Oryza sativa* L. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 104, 605-613.
- Meers, E., Samson, R., Tack, F.M.G., Ruttens, A., Vandegehuchte, M., Vangronsveld, J., Verloo, M.G., 2007. Phytoavailability assessment of heavy metals in soils by single extractions and accumulation by *Phaseolus vulgaris*. *Environmental and Experimental Botany* 60, 385-396.
- Menzies, N.W., Donn, M.J., Kopittke, P.M., 2007. Evaluation of extractants for estimation of the phytoavailable trace metals in soils. *Environmental Pollution* 145, 121-130.
- Miquel, G., 2001. Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé. Rapport parlementaire européen.
- Ohmsen, G. S., 2001. Characterization of fugitive material within a primary lead smelter. *J. Air Waste Manage. Assoc.* 51, 1443-1451.
- Oliver, D.P., Hannam, R., Tiller, K.G., Wilhelm, N.S., Merry, R.H. and Cozens, G.D., 1994. The effects of zinc fertilization on cadmium concentration in wheat grain. *J. Environ. Qual.* 23, 705-711.
- Parys, E., Romanowska, E., Siedlecka, M., and Poskuta, J., 1998. The effect of lead on photosynthesis and respiration in detached leaves and in mesophyll protoplasts of *Pisum sativum*. *Acta Physiologiae Plantarum* 20(3), 313-322.
- Pendergrass, A., Butcher, D.J., 2006. Uptake of lead and arsenic in food plants grown in contaminated soil from Barber Orchard, NC. *Microchemical Journal* 83, 14-16.
- Piechalak, A., Tomaszewska, B., Baralkiewicz, D., Malecka, A., 2002. Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. *Phytochemistry* 60, 153-162.
- Pueyo, M., Lopez-Sanchez, J.F., Rauret, G., 2004. Assessment of CaCl_2 , NaNO_3 and NH_4NO_3 extraction procedures for the study of Cd, Cu, Pb and Zn extractability in contaminated soils. *Analytica Chimica Acta* 504, 217-226.
- Ruby, M.V., Davis, A., Kempton, J.H., Drexler, J.W., Bergstrom, P.D., 1992. Lead Bioavailability: Dissolution Kinetics under Simulated Gastric Conditions. *Environ. Sci. Technol.* 26, 1242-1248.
- Ruby, M.V., Schoof, R., Brattin, W., Goldade, M., Post, G., Harnois, M., Mosby, D.E., Casteel, S.W., Berti, W., Carpenter, M., Edwards, D., Cragin, D., Chappell, W., 1999. Advances in evaluating the oral bioavailability of inorganics in soil for use in human health risk assessment. *Environ. Sci. Technol.* 33, 3697-3705.
- Sauvé, S., Dumestre, A., McBride, M., Hendershot, W., 1998. Derivation of soil quality criteria using predicted chemical speciation Pb^{2+} and Cu^{2+} . *Environmental Toxicology and Chemistry* 17(8), 1481-1489.
- Seregin, I.V., Kozhevnikova, A.D., 2004. Strontium transport, distribution, and toxic effects on maize seedling growth. *Russian Journal of Plant Physiology* 51, 215-221.
- Sharma, P., and Dubey, R.S., 2005. Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 35-52.
- Sobanska, S., Ricq, N., Laboudigue, A., Guillermo, R., Bremard, C., Laureyns, J., Merlin, J.C., Wignacourt, J.P., 1999. Microchemical investigations of dust emitted by a lead smelter. *Environ. Sci. Technol.* 33, 1334-1339.
- Sobanska S., Pauwels B., Maenhaut W. and Adams F., 2002. Single particle characterisation and sources of tropospheric aerosols in the Negev desert (Israel). *Journal de Physique IV* 12(Pr10), 161-183.

Sobanska, S., Falgayrac, G., Laureyns, J., Bremard, C., 2006. Chemistry at level of individual aerosol particle using multivariate curve resolution of confocal Raman image. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 64, pp. 1102–1109.

Twining, J.R., Payne, T.E., Itakura T., 2004. Soil-water distribution coefficients and plant transfer factors for ^{134}Cs , ^{85}Sr and ^{65}Zn under field conditions in tropical Australia. *J Environ Radioac* 71, 71-87.

Waisberg, M., Black, W.D., Waisberg, C.M., Hale, B., 2004. The effect of pH, time and dietary source of cadmium on the bioaccessibility and adsorption of cadmium to/from lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. *Ostinata*). *Food and Chemical Toxicology* 42, 835-842.

Wang, G., Su, M.Y., Chen, Y.H., Lin, F.F., Luo, D., Gao, S.F., 2006. Transfer characteristics of cadmium and lead from soil to the edible parts of six vegetable species in southeastern China. *Environmental Pollution* 144, 127-135.

Welch, R.M., 1995. Micronutrient nutrition of plants. *Critical Reviews in Plants Sciences* 14, 49-82.

WHO, 1987. Air quality guidelines for Europe. WHO Regional Publications, European Series No. 23.

Yin, Y., Impellitteri, C.A., You, S.J., Allen, H.E., 2002. The importance of organic matter distribution and exact soil : solution ratio on the desorption of heavy metals from soils. *The Science of the Total Environment* 287, 107-119.

Young, T.M., Heeraman, D.A., Sirin, G., Ashbaugh, L.L., 2002. Resuspension of soil as a source of airborne lead near industrial facilities and highways. *Environ. Sci. Technol.* 36, 2484-2490.

Zhang Z., C. Kleinstreuer, J.F. Donohue, C.S. Kim., 2005. Comparison of micro- and nano-size particle depositions in a human upper airway model. *J Aerosol Science* 36, 211–233.

Zheng, N., Wang, Q., Zheng, D., 2007. Health risk of Hg, Pb, Cd, Zn, and Cu to the inhabitants around Huludao Zinc Plant in China via consumption of vegetables. *Science of The Total Environment* 383, 81-89.

4.2. Transfert atmosphère-plante

4.2.1 Avant-propos

Le sous-chapitre précédent abordait le transfert des particules émises par le procédé de recyclage du plomb dans le système sol-plante par la voie racinaire. L'étude a montré que le transfert du plomb depuis le sol vers les parties aériennes augmente de 20% sur les sols testés lorsqu'ils sont contaminés avec des particules $PM_{2.5}$ par rapport à des PM_1 .

Cependant, si de nombreuses études décrivent le transfert sol-plante des métaux, aucune n'a encore démontré que ce transfert pourrait se faire par la voie atmosphérique.

Ce chapitre vise à donner des réponses sur ce type de transfert. En effet, le transfert foliaire de plomb via l'atmosphère est-il possible ? Si oui, sous quelle forme ? Particulaire, gazeux, ionique ? Quels sont les mécanismes ? Quelle est l'importance de cette voie vis-à-vis du transfert sol plante ? Une expérience de cultures de salades a été mise en place dans l'enceinte d'une usine de recyclage de batteries au plomb (STCM, Toulouse) et soumises aux émissions diffuses des ateliers et des engins de l'usine. Ces conditions sont extrêmes par rapport aux conditions d'un jardin potager à proximité d'une usine mais nécessaires pour cette expérience qui s'attache à mettre en évidence l'absorption foliaire.

Le contexte de la pollution engendrée par l'activité de cette entreprise a été décrit dans des travaux précédents (Uzu et al., 2009). 40 salades cultivées en pots sur sols non contaminés ont été exposées aux retombées atmosphériques sur des durées croissantes de 10 à 45 jours. Après lavage, les parties aériennes des végétaux ont été minéralisées et les concentrations en plomb ont été mesurées par ICP-AES. Afin de localiser le plomb (polluant principal) dans les feuilles lavées, des cartographies ont été réalisées par micro-fluorescence X, les feuilles ont été observées par microscopie électronique à balayage couplée à l'analyse chimique (MEB-EDS) et la spéciation du plomb dans les feuilles par microspectrométrie Raman (RMS).

Des investigations physico-chimiques ont permis de montrer que l'absorption foliaire directe pour des particules atmosphériques était possible. Des techniques spectrométriques ont déterminé la spéciation du plomb dans la feuille mais aussi sa

localisation. Des observations microscopiques menées sur les feuilles ont montré les dommages engendrés par la phytotoxicité des métaux, et ont permis de proposer des mécanismes d'absorption.

Ce chapitre correspond à un article accepté dans Environmental Science and Technology :

Uzu G., Sobanska S., Sarret G., Munoz M. and Dumat C. Foliar lead uptake by lettuce exposed to atmospheric fallouts.

4.2.2 Foliar lead uptake by lettuce exposed to atmospheric fallouts.

Gaëlle Uzu, Sophie Sobanska, Géraldine Sarret, Manuel Muñoz and Camille Dumat*

Gaëlle Uzu & Camille Dumat: Université de Toulouse ; UPS, INP ; EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle) ; ENSAT, Avenue de l'Agrobiopôle, F-31326 Castanet-Tolosan, France, CNRS ; EcoLab ; F-31326 Castanet-Tolosan, France .phone: 0033687294973, fax: 0033562193901 e-mail: camille.dumat@ensat.fr; Sophie Sobanska: LASIR, UMR 8516 USTL, Bâtiment C5 - 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France Géraldine Sarret: Environmental Geochemistry Group, LGIT (UMR 5559), Univ. J. Fourier and CNRS, 38041 Grenoble cedex 9, France; Manuel Muñoz: Mineralogy and Environments group, LGCA (UMR 5025), OSUG - Univ. J. Fourier, 1381 rue de la Piscine, 38041 Grenoble cedex 9, France.

4.2.2.1 Abstract

Metal uptake by plants occurs by soil-root transfer, but also by direct transfer of contaminants from the atmosphere to the shoots. This second pathway may be particularly important in kitchen gardens near industrial plants. The mechanisms of foliar uptake of lead by lettuce (*Lactuca sativa*) exposed to the atmospheric fallouts of a lead-recycling plant were studied. After 43 days of exposure, the leaves thoroughly washed contained 335 ± 50 mg Pb.kg⁻¹ DW. Micro X-ray fluorescence (μ XRF) mappings evidenced Pb-rich spots of a few hundreds of micrometers in diameter located in necrotic zones. These spots were more abundant at the base of the central nervure. Environmental scanning electron microscopy coupled with energy dispersive X-ray microanalysis (ESEM-EDX) showed that smaller particles (few μ m in diameter) were also present in other regions of the leaves, often located beneath the leaf surface. In addition, submicrometric particles were observed inside stomatal openings. Raman Microspectrometry (RMS) analyses of the leaves identified smelter-originated Pb minerals but also secondary phases likely resulting from the weathering of original particles. Based on these observations, several pathways for foliar lead uptake are discussed. A better understanding of these mechanisms may be of interest for risk assessment of population exposure to atmospheric metal contamination.

4.2.2.2 Briefs

The mechanisms of foliar uptake of lead in lettuce exposed to atmospheric Pb-rich fallouts are studied.

4.2.2.3 Introduction

Particles emitted in the atmosphere present a large variety of sizes (1) and during the last decade, the proportion of fine particle matter (PM) increased with the use of more effective filters in industry (2). PM₁₀ (PM whose aerodynamic diameter is less than 10 µm) are target species of the World Health Organization (3) and the European Union Framework Directive on ambient air quality assessment (4) due to their adverse effects on the environment and human health. While PM_{2.5}, PM₁ and nanoparticles are minor components of total emitted particles, they are probably the most important in terms of environmental impact. Indeed, they can be transported over long distances in the troposphere (5-6) and due to their high specific area they can strongly impact the biosphere (7-8).

At the global scale, fallouts of atmospheric PM represent the main source of lead pollution in soils (9). Despite the strong decrease in industrial and vehicle lead emissions in recent decades (10), lead-enriched PM are still emitted in the environment, especially by lead-recycling facilities (11-12-13). In a previous study on particles rejected by such a facility, a large proportion of submicrometric size particles was observed (7). Toxic for living organisms even at low concentrations (14), lead can be ingested as polluted soil and dust particles by children (15). Additional routes of exposure, which are more important for adults, include drinking water contamination and consumption of locally produced vegetables grown in kitchen gardens (16).

Lead is known to be weakly mobile in soils (17-18), with a residence time estimated to several hundreds of years (19). Lead concentrations in vegetables from kitchen gardens contaminated by atmospheric PM are not correlated with soil contents (20). The main reason is that plant uptake is correlated to the phytoavailable fraction of lead rather than to the total metal burden. However, this absence of correlation may be due to a direct metal contamination through the shoots. Airborne contamination of plants by lead and other metals (21-22-23) and by radionuclides (24) was evidenced

in previous studies. However, the mechanisms responsible for the foliar uptake are still unclear and the literature on this topic is very limited compared to soil-root transfer. Most studies on foliar transfer concern plant nutrients in the context of foliar fertilization (25-26-27-28) and to our knowledge there is no study on the mechanisms of foliar uptake of lead.

Terrestrial plants have kept from their aquatic ancestors the ability to absorb nutrients through the leaves (25), and contaminants may follow the same pathway. Nutrients and contaminants have to cross several physical barriers before entering the cytosol of epidermal cells. This penetration is strongly dependant of weather conditions, plant species, physiological status and speciation of the element (26). There are two parallel routes for crossing the cuticle, the lipophilic and the hydrophilic pathway (29-30). The lipophilic pathway is not considered in this study because it concerns apolar and non-charged molecules, which cross the cuticle by diffusion in cutin and waxes. Ions and hydrophilic solutes follow the hydrophilic pathway via aqueous pores (29). This pathway requires dissolution of the compounds which depends mostly on the humidity, and on the hygroscopicity and solubility of the particles (26). When the humidity is above the point of deliquescence, the compound partly dissolves and penetration proceeds from this saturated solution. Aqueous pores are located over anticlinal walls and on cuticular ledges of stomata guard cells (30-31). Once a contaminant has crossed the cuticle, it may remain in the apoplasm or be transported inside cells (32). Beside this hydrophilic pathway for solutes, a solid-state pathway also exists. Stomata enable the uptake of suspended nanoparticles and their diffusion in the apoplasm. The stomatal pathway is considered as highly capacitive because of its large size exclusion limit 10 nm-1µm and its high transport velocity (33).

The first objective of the present study was to evaluate the transfer of lead from atmospheric contamination in lettuce, a widely cultivated vegetable already used as a model plant in metal transfer studies (16, 34-35). Secondly, this work aimed at investigating the mechanisms of lead foliar uptake by monitoring Pb leaves content over a 43-day exposure time and determining its localization and speciation in the leaves. Such knowledge can be of high interest for risk assessment. Lettuces were first exposed to the fallouts of a plant recycling batteries emitting lead-rich particles (333,000 mg Pb/kg particles) have been previously characterized (7). The total content of lead in the leaves was determined after carefully washing. Micro X-ray fluorescence (µXRF) was used to study the distribution of lead and other elements on centimetric zones of leaves with a lateral resolution of 50 µm. Environmental scanning electron microscopy coupled with energy dispersive X-ray microanalysis (ESEM-EDX) was used to determine the morphology and elemental composition of

lead deposits at a higher resolution, and Raman Microspectrometry (RMS) provided the molecular composition of lead-rich areas. The results obtained were then discussed and possible scenarios for lead foliar uptake were proposed. To our knowledge, this is the first study of foliar transfer of metals on vegetable samples originating from a field study using a combination of physical and chemical techniques.

4.2.2.4 Experimental section

4.2.2.4.1 Lettuce exposure to atmospheric lead fallouts

Commercial lettuce seeds, “Batavia blonde dorée” cultivar, were surface sterilized with 0.9% CaClO for 15 min and rinsed with deionised water. Lettuces were first grown hydroponically for 10 days before transfer in pots in a greenhouse for 15 days to get plants of about 15 g (fresh biomass). After this period, 40 lettuces were placed in pots containing four kg of uncontaminated calcareous soil (total lead concentration: $25 \pm 2 \text{ mg.kg}^{-1}$). Each pot contained one plant. A geotextile membrane was placed on the soil surface to protect it against atmospheric fallouts. Plants were exposed for 43 days in the courtyard of a secondary lead smelter which recycles batteries (7). Every ten days, five replicates were harvested. In addition, five control plants placed in an urban area at 15 km from the smelter were harvested after 43 days. Lead concentration in the courtyard of the recycling-plant was $1 \mu\text{g Pb.m}^{-3}$ air and lead concentration in PM Emissions was $330\,000 \text{ mg Pb.kg}^{-1}$. According to the French authorities (36), 328 kg of Total Suspended Particles (TSP) including 31 kg of lead were emitted by this facility in 2007. The particles emitted by this smelter were characterized in a previous study by X-ray diffraction and Raman spectroscopy (7). Lead speciation was, in decreasing order of abundance, PbS, PbSO₄, PbSO₄ · PbO, α-PbO and Pb⁰.

4.2.2.4.2 Chemical Analysis of soils and vegetables

After harvesting and removal of the roots, the shoot biomass was measured. Each lettuce was cut in four quarters and one was randomly picked for analyses. The leaves were cut at their base, and each one was washed, first in running tap water for 30 seconds and then in two baths of de-ionized water for one minute, in order to eliminate particles present on the leaf surface but not tightly bound. After draining the leaves with a salad-spin and drying at 50°C for 48h, leaf and soil samples were

digested, in a 1:1 mixture of HNO₃ and H₂O₂ at 80 °C for 4 h and in hot aqua regia, respectively. After filtration, lead concentration was measured by inductively coupled plasma – atomic emission spectrometry (ICP-AES) with an IRIS Intrepid II XDL. The accuracy of the acidic digestion and analytical procedures was checked using the reference material Virginia tobacco leaves, CTA-VTL-2, ICHTJ. Certified values for lead in Tobacco leaves were given for 22.1 ± 1.2 mgPb.kg⁻¹ dry weight. Measured values for the three replicates were 22.0 ± 0.9, 22.4 ± 0.8 and 21.9 ± 0.8 mgPb.kg⁻¹ dry weight. The leaves of the lettuces after 43 days of exposure were then studied by μXRF, ESEM-EDX and RMS.

4.2.2.4.3 X-ray microfluorescence (μXRF)

Elemental distributions in various regions of the leaves were determined by μXRF. Fresh washed leaves were freeze dried, flattened on the sample holder and placed under vacuum. μXRF spectra were collected with an EDAX Eagle III XRF spectrometer, equipped with a Rh anode and a poly-capillary that focuses the X-ray beam down to 30 μm full width at half maximum (FWHM). An EDX detector with 140 eV resolution was used to measure the X-ray fluorescence. The spectrometer was operated at 15 or 20 kV, and 300 to 450 μA. Centimetric sized X-ray maps were collected over 256 by 200 pixels with steps of 30 to 50 μm. The counting time was 600 to 2000 ms per pixel. Detection limits for such apparatus is around 100 ppm for Pb and other heavy elements. Deconvolution of μXRF spectra were needed since the S K- and Pb M-lines overlap within the 140 eV resolution of the EDX detector (Fig. 1b). It was performed using the EDAX-integrated software Vision32. Despite the peak overlap, the statistics on Pb fluorescence signal was better using Pb M-line than Pb L-line at higher voltage (40 kV). Elemental maps were combined as RGB (red-green-blue) 3-color maps using Matlab™. In addition, the XRF spectra for the Pb-rich particles obtained by summing single-pixel spectra in the spot of interest were compared.

4.2.2.4.4 Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM-EDX)

Morphology and elemental distribution were studied using an ESEM (Quanta 200 FEI) equipped with an EDX detector Quantax (Rontec). It was operated at 25 kV in the low vacuum mode. Semi-quantification measurements were obtained with ZAF correction and using real standards. Leaves were air dried and fixed on a carbon substrate before analysis. As for the μXRF analyses, Pb M- and S K-peaks were separated by deconvolution.

4.2.2.4.5 Raman microspectrometry (RMS)

Molecular identification of particles present on or beneath the leaf surface of lettuce leaves was performed using RMS. Leaf samples collected after 43 days of exposure were fixed on a glass plate and mounted on the microscope stage without further preparation. In most cases, particles (or leave areas) were analyzed by both ESEM-EDX and RMS after a careful re-localization, thus electronic and optical images as well as elemental and molecular compositions could be compared. RMS measurements were carried out using a Labram Confocal spectrometer and a Labram HR UV 800 (Jobin Yvon, Horiba Gr, France). The Raman backscattering was excited with 632.8 nm or 266 nm excitation wavelength supplied by a He-Ne and a solid MBD 266 system (Coherent – laser group), respectively. The beams were focused on the sample surface through an optical objective (visible Olympus objective, X100, 0.9 NA and UV Mitutoyo objective X80, 0.55 NA) with a lateral resolution (XY) less than 1 μm in both cases. The excitation using a UV laser (266 nm) was necessary to probe the surface of leaves since many biologically important molecules such as chlorophyll have an intense fluorescence emission when excited in the visible range (400 nm $<\lambda <$ 800 nm). Fluorescence cross sections are typically several orders of magnitude larger than Raman scattering cross-section and masks any underlying Raman spectra. The Raman spectra were analyzed based on the shifts in Raman peak values, changes in full width at half maximum (FWHM) ratios of Raman bands, and normalized intensity variations. For identification of chemical species, measured Raman spectra (band wave number and relative intensities) with flat base line were compared with spectra in established libraries using Spectral Library Search ID 301 software (Thermo Galactic). The hit quality index (HQI) represents the closeness of the match between the unknown and a particular library entry. Raman spectra libraries used are listed in the supporting information. In addition to these databases, Raman spectra of relevant Pb compounds including solid-state phases and aqueous solutions were recorded to check for possible differences due to instrumental functions. Further information about identification of Pb minerals using RMS can be found elsewhere (12, 37).

4.2.2.4.6 Statistical data treatment

Amount of lead in plant obtained were subjected to analysis of variance (ANOVA) with one factor, using the software Statistica, Edition'98 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Significant differences ($p < 0.05$) were measured by LSD Fisher test.

4.2.2.5 Results and discussion

4.2.2.5.1 Foliar lead uptake

Pb average concentrations in washed leaves after 0, 13, 23, 34 and 43 days of atmospheric fallouts exposure were 0.22 ± 0.09 , 69 ± 15 , 139 ± 40 , 217 ± 40 , 335 ± 50 mg.kg^{-1} dry weight (DW), respectively. These values were all significantly different, and lead enrichment as a function of time followed a linear law, without plateau at 43 days of exposure:

$$[\text{Pb}]_{\text{leaves}} = 6.98 \times (\text{number of days of exposure}), r^2=0.96, n=5.$$

No significant difference in leaf biomass was noticed between control and exposed plants (40 ± 5 g DW after 43 days), and plants stayed green and healthy despite some necrotic spots (see below). The comparison of the total lead concentrations in leaves between the exposed and control plants after 43 days (335 ± 50 and 5 ± 3 mg.kg^{-1} , DW, respectively) suggests a strong foliar lead uptake by exposed plants. Other lettuces cultivated at 250 and 400 meters from the smelter (not investigated in this study) contained 30 and 15 mg.kg^{-1} , DW, respectively. Thus, lead content strongly varies as a function of the distance to the smelter. A survey of reported metal contents in vegetables in potentially contaminated sites (38) showed a great variability as a function of sampling sites and environmental conditions. According to EU requirements for consumption (4), lead concentration shouldn't exceed 0.3 mg Pb.kg^{-1} fresh biomass in leaf-vegetables corresponding to 3.26 mg Pb.kg^{-1} DW in our study (DW reached 10.85% in exposed lettuces). Thus, this threshold value were reached after 0.5 day of exposure in the plant courtyard. The relatively high lead content measured in control plants could result from soil-root uptake. However, this latter hypothesis is not likely because the control soil was chosen for its relatively high pH (8.4) and carbonates amount (98 g.kg^{-1}) to minimize Pb availability (17, 39) and low lead content. Lead present in the control plant more likely results from diffuse Pb contamination of the urban environment.

After exposure, no variation of lead content in the soil contained in the pots was observed ($< 30 \text{ mgPb.kg}^{-1}$). However, this is not a proof that Pb root uptake did not occur. Supposing that Pb contained in the control plants only originates from the substrate (which likely overestimates the soil-root transfer), the amount of lead taken up by roots would represent only 1.5% of total Pb measured in the leaves after 43 days of exposure in the plant courtyard. So the soil-root uptake of Pb can be neglected relative to the foliar uptake. In conclusion, the strong Pb enrichment in

exposed plants is due to a foliar contamination. Considering that vegetables were thoroughly washed, lead was at least strongly bound to the leaf surface or internalized.

4.2.2.5.2 Lead distribution in the leaf, spatially-resolved speciation and phyto-toxicity symptoms

The distribution of lead and other elements was investigated at the leaf-scale by μ XRF on ten leaves on centimetric zones. Figure 31 shows the analysis of the basal part of a leaf. Four lead-rich zones of a few hundreds of micrometers corresponding to brownish necrotic zones were observed (spot 1 to 4 in Figure 31c). The μ XRF spectra for the four spots, obtained by summing single pixel spectra, are shown in Figure 1b. The spots contain the same elements but in varying proportions: Spot 1 is richer in S, Ca, Si and Fe whereas spots 2, 3 and 4 are richer in Mn, and spot 4 contains less K. The same type of elemental distributions and grain compositions were observed in other parts of the leaves (Figure S34 supporting information). A μ XRF map of a Pb-rich necrosis obtained at a higher resolution (20 μ m step size) showed that although Ca and Mn present high local concentrations, their distribution does not quite match Pb distribution (Figure S35, SI). No diffuse lead concentration was detected in the leaf tissue. The detection limit of the instrument is relatively high (around 100 ppm for Pb), so one cannot conclude on the absence of lead in the leaf tissue. Another type of necrosis was observed on the leaves of both on control and exposed plants, small black spots rich in Mn (Figure 31d). They are symptoms of Mn toxicity resulting from reductive dissolution due to water saturation phenomenon of the substrate (40), and are not related to Pb contamination.

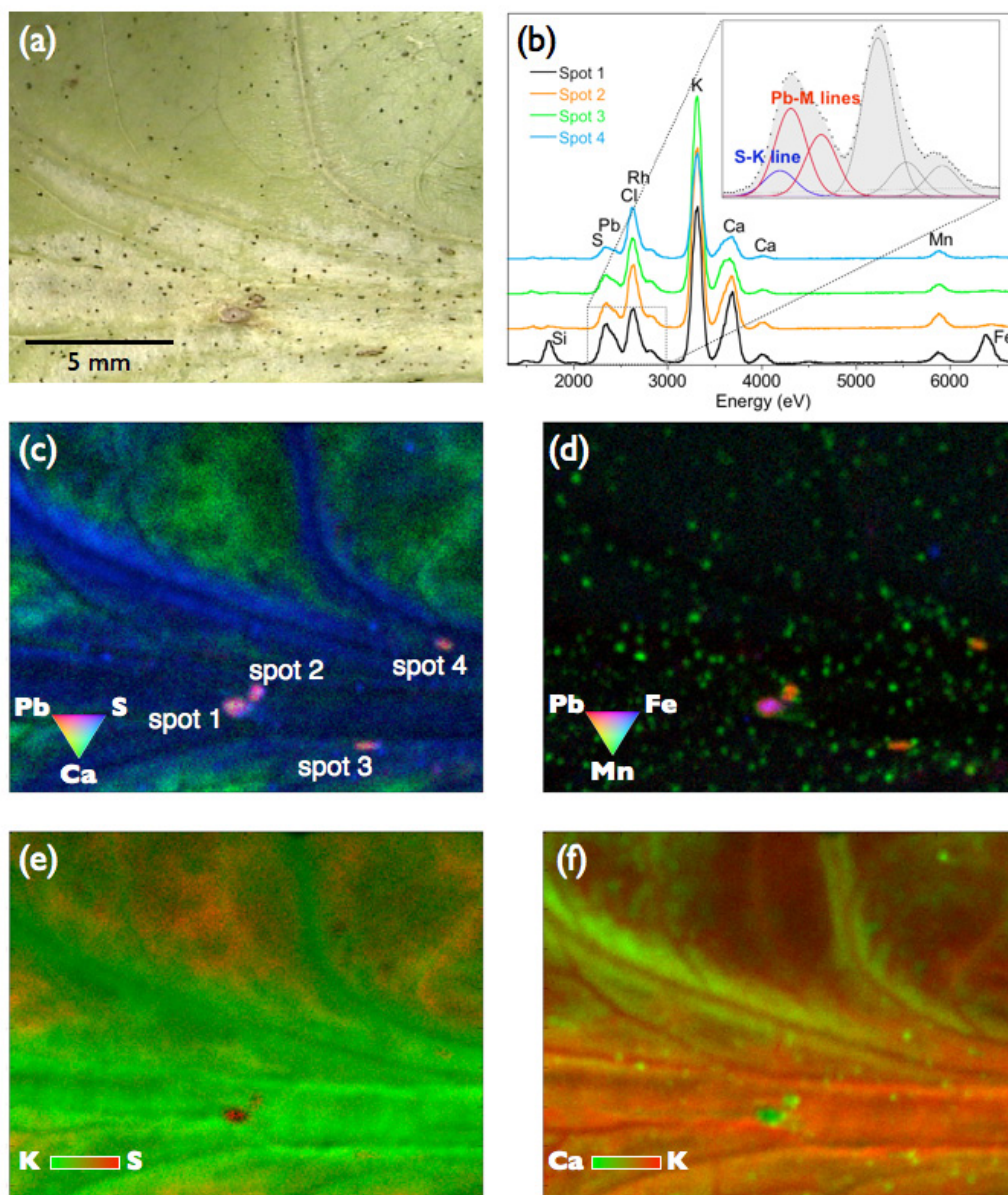


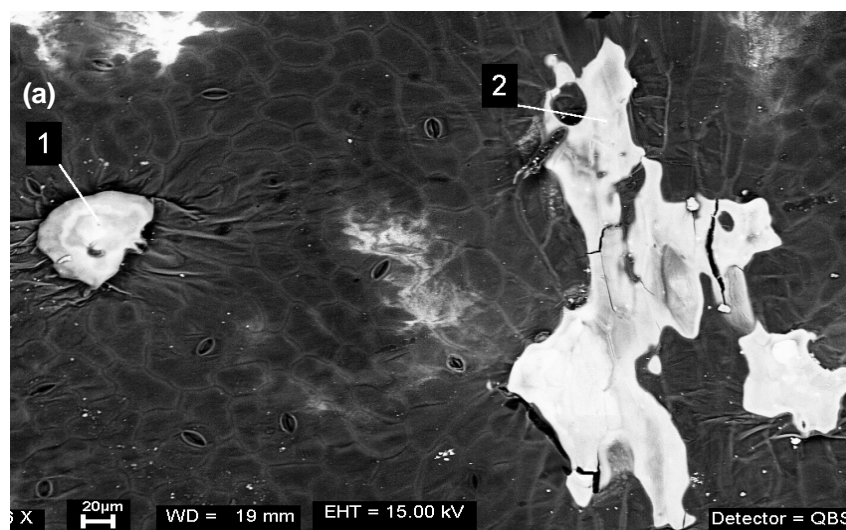
Figure 31 (a) Optical image of the basal part of the lettuce leaf exposed to atmospheric fallouts. Brownish spots correspond to Pb-associated necroses. (b) XRF spectra of Pb-rich necroses shown in (c). (c-f) Tri color and two color μ XRF elemental maps for Ca, Pb and S (c), Fe, Pb and Mn (d), K and S (e), and Ca and K (f)..

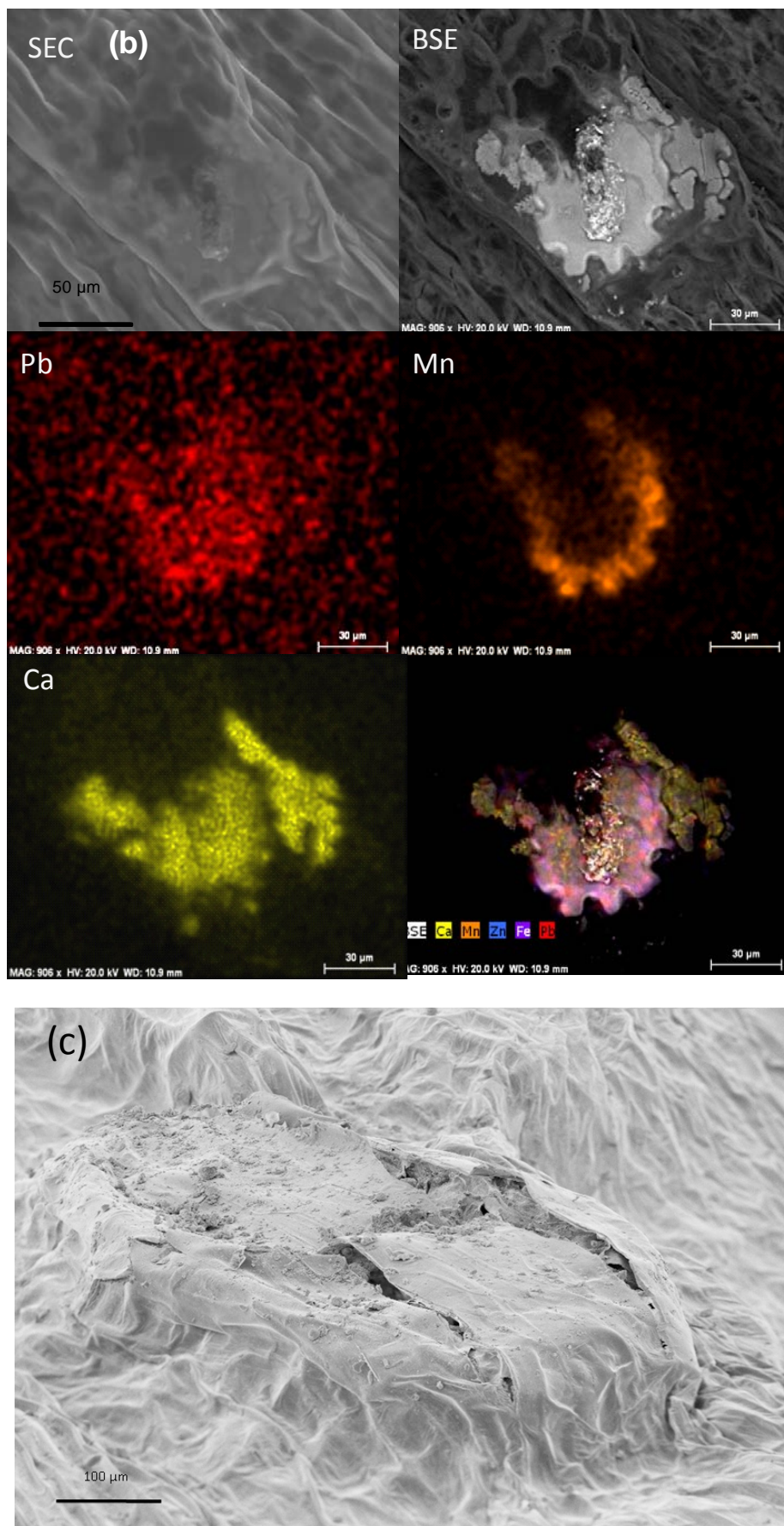
The leaves were then studied at a higher resolution by ESEM-EDX and RMS. A variety of Pb-rich necroses were investigated (Figure 32a-c and Figure S36, SI). As shown by μ XRF, EDX maps showed a heterogeneous distribution of Pb within a Ca- and Mn-containing phase (Figure 32b). P and K elements were detected in all the necroses, suggesting the presence of an organic membrane covering the precipitates. This organic layer was clearly visible on the secondary electron images

(e.g., Figure 32b-c and Figure S36, SI) and on optical image performed under UV light (e.g., Figure S37, SI). The RMS measurements carried out using a laser beam with a wavelength in the visible region showed an intense fluorescence signal typical of organic substances (e.g. chlorophyll). Measurements using a laser beam at 266 nm allowed probing the compounds beneath this organic membrane. The Ca, Mn phase was identified by Raman as a mixed carbonate i.e. $(Ca_{1-x}Mn_x)CO_3$ thanks to a characteristic intense Raman band at 1087 cm^{-1} corresponding to the symmetric stretching (\square_1) of carbonate group (symmetry D_{3h}) in the calcite-like structure (space $R\bar{3}c$

group). Small particles of MnO_2 and $PbSO_4$ were found within this carbonate precipitate (Figure S38, SI). The Raman bands at $\sim 1580\text{ cm}^{-1}$ and $\sim 1300\text{ cm}^{-1}$ found on many spectra were assigned to carbonaceous material resulting from the degradation of the organic membrane by the laser beam.

Necroses associated to metal accumulations have already been observed for Cd in *Brassica juncea* L. (41) and *Thlaspi caerulescens* (42) in the case of metal root uptake, and for Pb in *Arabidopsis thaliana* in the case of foliar uptake (43). Necroses are formed by dead cells and are symptoms of relatively acute toxicity. In the present study, metal-rich necroses suggest a toxic effect of metals (Pb, Zn, Fe, Cu, Mn depending on the spot, Pb being generally the most concentrated one). A likely scenario is the transfer of some metals in the intracellular compartment, leading to interferences with the cell metabolism. Further microscopic investigations are required to confirm this hypothesis.





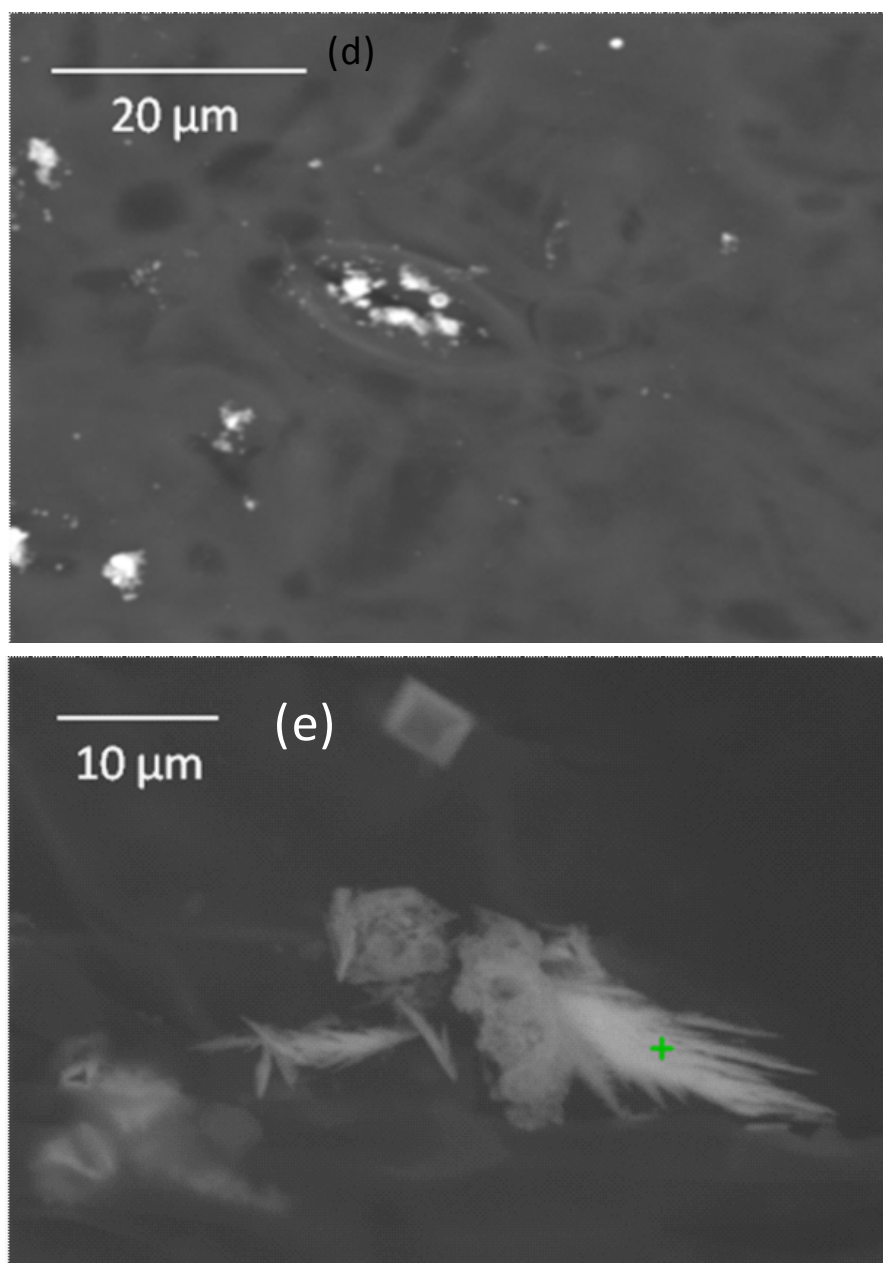


Figure 32 . ESEM-EDX analyses of Pb-rich regions on lettuce leaves exposed to atmospheric fallouts. (a) Two large necroses shown in BSE mode. The EDX semi-quantification for spots 1 and 2 gave 9% Pb, 1% Cl, 1% Mn, 1% Fe, 20% O, 2% Mg and 65% P. (b) SE and BSE images of a necrosis, elemental distribution of Pb, Ca and Mn, and multi-color map showing the distribution of Ca, Mn, Zn, Fe and Mn. (c) SE image of a necrosis. Particles are visible on the leaf surface, as well as beneath the surface. (d) Stomata plugged by Pb-containing particles (e) Secondary Pb-containing compounds formed on the leaf surface.

In all leaves studied, the base of the central vein contained more particles than the other regions of the leaf. This phenomenon is likely due to rainfall and watering which flushed the particles towards the basal part of the leaves. It was already reported in the case of radionuclide-containing particles (44). In order to reduce the risk induced

by vegetables potentially exposed to atmospheric fallouts, a simple recommendation could consist in eliminating the basal part of leaves before consumption.

Particles were also present on the leaf surface (Figure S39, SI). Individual particles and aggregates were a few micrometers to a few tens of micrometers in diameter. The major elements detected by EDX in particles/aggregates were Pb, S, Cl, Fe, Ca, Si and Al. The RMS analysis of the particles allowed the identification of anglesite (PbSO_4), lanarkite ($x\text{PbO} \cdot \text{PbSO}_4$), quartz ($\alpha\text{-SiO}_2$), amorphous iron oxyhydroxyde (FeOOH), calcite (CaCO_3), hydrocerussite ($\text{Pb}_3(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_2$), cerussite (PbCO_3) and some fluorescent species attributed to clay minerals (Figure S40, SI). Clay may result from the deposition of non-contaminated dust. PbS was not detected because this mineral is almost silent in Raman (a weak and broad Raman band is observed at 451 cm^{-1}), and this compound readily transform into lead sulphate products under the laser beam (45).

PM were also frequently observed inside stomatal openings on adaxial and abaxial surfaces (Figure 32d and Figure S41, SI). These PM had a diameter comprised between 50 nm and 1 μm and minerals identified by RMS included PbSO_4 and PbO. The presence of these particles in stomata may have two consequences. Firstly, clogging ostioles disturbs leaf physiology by decreasing the stomatal conductance and gas exchanges and perturbing the water regime, transpiration and control of leaf temperature (46). Secondly, toxic metals may penetrate inside leaves via stomata (33).

Although some aggregates presented the same morphology as source particles characterized previously (7), 3-4% of needles crystallites were observed on leaf surface (ratio of needle-like particles to the total number of particles observed, Figure 32e and Figure S42, SI). These crystallites were not observed in source particles (7). EDX analyses showed Pb, K and Cl as major constituents of the needle structures whereas other elements such as Sn, Ca, K and Fe were found in non-spherical particles associated with the needles. These crystallites were not made of lead phosphate. RMS measurements showed that they were very beam sensitive and intense PbO and elemental carbon signals were observed after beam damage. These observations suggest that the needles are made of lead-organic species. This was confirmed by spectra recorded at very low laser power on which not very intense Raman bands at $\sim 2800 \text{ cm}^{-1}$ and $\sim 1780 \text{ cm}^{-1}$ characteristic of C-H and C-O bonds, respectively, were observed. These particles may correspond to secondary phases resulting from the dissolution of original particles on the leaf and precipitation with organic compounds present on the cuticle. These changes in particles' morphology

and speciation may result from abiotic processes. However, the surface of plant leaves is generally colonized by microorganisms which may participate to chemical processes taking place at this interface (47-48). Further investigations are required to evaluate the bacterial colonization on the lettuce leaves and the possible participation of microorganisms to the alteration of the particles.

4.2.2.5.3 Potential mechanisms involved in foliar absorption

The results of this study clearly show that some lead is trapped both on the leaf surface and inside the leaf. Based on our observations and on the present knowledge on foliar uptake of elements, several mechanisms can be tentatively proposed for these processes (Figure 3). Firstly, particles deposited on the leaf surface may be trapped in the tiny folds of the leaf and remain as such. The original particles contain PbS which is highly reactive and subjected to oxidation and weathering processes, and secondary Pb-containing compounds may form on the leaf surface. The chemical processes of PbS oxidation under atmospheric conditions have been described previously (45, 49), and lead to the formation of PbO, PbSO₄, PbO · PbSO₄ and PbCO₃. These transformations may occur in the atmosphere during the transport of particles, and after their deposition on plant leaves. In parallel, lead may penetrate inside the leaf by two pathways. Firstly, lead-containing nanoparticles observed in the stomata may penetrate in the apoplasm as solid compounds. In this study nanoparticles were observed only in stomatal openings. Further analyses, particularly the study of leaf cross sections, are necessary to test whether nanoparticles enter the leaves via stomata. In addition, particles were observed beneath an organic membrane, probably the cuticle. Again, further investigations are needed to determine their exact localization and the way they were transferred in this place. Secondly, lead resulting from the dissolution of source particles may diffuse through aqueous pores of the cuticle and of the stomata, following the hydrophilic pathway inducing the formation of necroses enriched with lead.

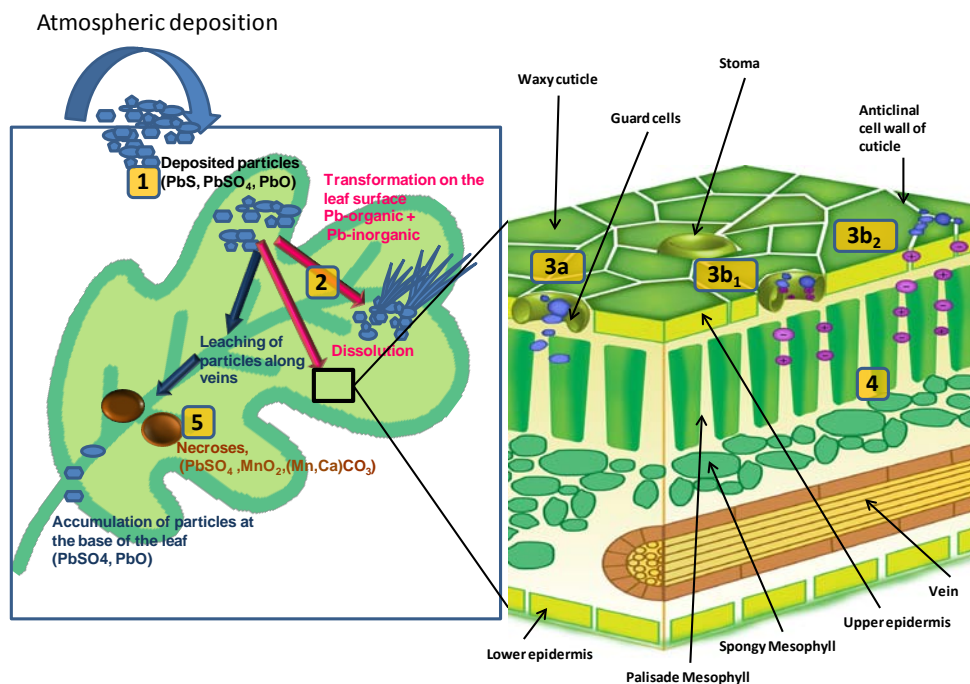


Figure 33 : Tentative pathways for lead uptake after deposition of Pb-containing particles. Deposition of particles on the leaf surface (1), chemical transformation on the leaf surface leading to secondary Pb-containing phases and possibly solutes (2). Accumulation of particles in stomata and possibly penetration of nanoparticles (3a). Possible diffusion of solutes via aqueous pores present on cuticular ledges of stomata (3b₁) and anticlinal cell walls of cuticles (3b₂). Toxicity symptoms (necroses) induced by the presence of the contaminated particles on the leaf (4).

Our results suggest that various pathways may lead to foliar uptake of Pb by lettuce exposed to Pb-rich PM. The fate of metal contaminants in the soil and their soil-plant transfer has to be evaluated in metal-contaminated soils, but the foliar transfer is another important issue, which is much less studied. Indeed, in the context of agricultural activities established near metallurgic activities, plant metal uptake may occur predominantly via foliar contamination by micro- and nanoparticles. Microscopic and micro-spectroscopic investigations of the plants provided insights on the fate of PM deposited on lettuce leaves. Such knowledge may be of interest on a physiological point of view and in the perspective of risk assessment of atmospheric emissions in urban environments.

4.2.2.6 Acknowledgment

ADEME, the French Agency for Environment and Energy as well as the STCM, are acknowledged for their financial support and technical help. This research project was supported by the National CNRS CYTRIX-EC2CO program. We thank M. Boidot for Figure 3, P. Recourt from Laboratoire Geosystèmes, UMR CNRS 8157, University of Lille for ESEM-EDX measurements, and M. Corazzi for his help during the μ XRF measurements.

4.2.2.7 References

1. Zhang, Z.; Kleinstreuer, C.; Donohue, J.; Kim, C. Comparison of micro- and nano-size particle depositions in a human upper airway model. *Journal of Aerosol Science*. 2005, 36, 211-233.
2. Müller, D.; Mattis, I.; Kolgotin, A.; Ansmann, A.; Wandinger, U.; Althausen, D. Characterization of atmospheric aerosols with multiwavelength Raman lidar. In *Proceedings of SPIE, Florence, Italy*. 2007, pp 67500G-67500G-11.
3. WHO. *Air Quality Guidelines for Europe. European Series*. 1987, number 23.
4. European Commission. 2002. Commission Regulation (EC) No 221/2002 of 6 February 2002 amending Regulation (EC) No 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs.
5. Dordevic, D.; Vukmirovic, Z.; Tosic, I.; Unkasevic, M. Contribution of dust transport and resuspension to particulate matter levels in the Mediterranean atmosphere. *Atmospheric Environment*. 2004, 38, 3637-3645.
6. Arimoto, R. Eolian dust and climate: relationships to sources, tropospheric chemistry, transport and deposition. *Earth-Science Reviews*. 2001, 54, 29-42.
7. Uzu, G.; Sobanska, S.; Aliouane, Y.; Pradere, P.; Dumat, C. Study of lead phytoavailability for atmospheric industrial micronic and sub-micronic particles in relation with lead speciation. *Environmental Pollution*. 2009, 157, 1178-1185.
8. Fernandez Espinosa, A. J.; Oliva, S. R. The composition and relationships between trace element levels in inhalable atmospheric particles (PM10) and in leaves of *Nerium oleander* L. and *Lantana camara* L. *Chemosphere*. 2006, 62, 1665-1672.
9. Donisa, C.; Mocanu, R.; Steinnes, E.; Vasu, A. Heavy Metal Pollution by Atmospheric Transport in Natural Soils from the Northern Part of Eastern Carpathians. *Water, Air & Soil Pollution*. 2000, 120, 347-358.
10. Gloennec, P.; Bemrah, N.; Tard, A.; Robin, A.; Bot, B. L.; Bard, D. Probabilistic modeling of young children's overall lead exposure in France: Integrated approach for various exposure media. *Environment International*. 2007, 33, 937-945.
11. Sobanska, S.; Ledesert, B.; Deneele, D.; Laboudigue, A. Alteration in soils of slag particles resulting from lead smelting. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Series IIA - Earth and Planetary Science*. 2000, 331, 271-278.
12. Batonneau, Y.; Bremard, C.; Gengembre, L.; Laureyns, J.; Le Maguer, A.; Le Maguer, D.; Perdrix, E.; Sobanska, S. Speciation of PM10 Sources of Airborne Nonferrous Metals within the 3-km Zone of Lead/Zinc Smelters. *Environmental Science & Technology*. 2004, 38, 5281-5289.
13. Ohmsen, G. S. Characterization of fugitive material within a primary lead smelter. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 2001, 51, 1443-1451.
14. Canfield, R. L.; Henderson, C. R.; Cory-Slechta, D. A.; Cox, C.; Jusko, T. A.; Lanphear, B. P. Intellectual Impairment in Children with Blood Lead Concentrations below 10 µg per Deciliter. *N. Engl. J. Med.* 2003, 348, 1517-1526.
15. Alloway, B. J. *Heavy metals in soils*. 2nd Edition, Blackie Academic & Professional, London. 1995.
16. Alexander, P.; Alloway, B.; Dourado, A. Genotypic variations in the accumulation of Cd, Cu, Pb and Zn exhibited by six commonly grown vegetables. *Environmental Pollution*. 2006, 144, 736-745.
17. Cecchi, M.; Dumat, C.; Alric, A.; Felix-Faure, B.; Pradere, P.; Guisresse, M. Multi-metal contamination of a calcic cambisol by fallout from a lead-recycling plant. *Geoderma*. 2008, 144, 287-298.
18. Dumat, C.; Chiquet, A.; Goody, D.; Aubry, E.; Morin, G.; Juillot, F.; Benedetti, M. F. Metal ion geochemistry in smelter impacted soils and soil solutions. *Bulletin de la Société Géologique de France*. 2001, 172, 539-548.

19. Klaminder, J.; Bindler, R.; Laudon, H.; Bishop, K.; Emteryd, O.; Renberg, I. Flux rates of atmospheric lead pollution within soils of a small catchment in northern Sweden and their implications for future stream water quality. *Environmental Science & Technology*. 2006, 40, 4639-4645.
20. Douay, F.; Roussel, H.; Pruvot, C.; Loriette, A.; Fourier, H. Assessment of a remediation technique using the replacement of contaminated soils in kitchen gardens nearby a former lead smelter in Northern France. *Science of The Total Environment*. 2008, 401, 29-38.
21. Tjell, J.C.; Hovmand, M.F.; Mosbaek, H. Atmospheric lead pollution of grass grown in a background area in Denmark. *Nature*. 1979, 280, 425-426.
22. Mosbaek, H.; Tjell, J.C.; Hovmand, M.F. Atmospheric lead input to agricultural crops in Denmark. *Chemosphere*. 1989, 19, 1787-1799.
23. Kozlov M.V.; Haukioja E.; Bakhtiarov A.V.; Stroganov D.N.; Zimina S.N. Root versus canopy uptake of heavy metals by birch in an industrially polluted area: contrasting behavior of nickel and copper. *Environmental Pollution*. 2000, 107, 413-420.
24. Madoz-Escande, C.; Henner, P.; Bonhomme, T. Foliar contamination of *Phaseolus vulgaris* with aerosols of ¹³⁷Cs, ⁸⁵Sr, ¹³³Ba and ^{123m}Te: influence of plant development stage upon contamination and rain. *Journal of Environmental Radioactivity*. 2004, 73, 49-71.
25. Mengel, K. Alternative or complementary role of foliar supply in mineral nutrition. In *Proceedings of the international symposium on foliar nutrition of perennial fruit plants* (Tagliavini, M., Toselli, M., Bertschinger, L., Neilsen, D. and Thalheimer, M., Éd.), International Society Horticultural Sc., po box 500, 3001 Leuven 1, Belgium., PO BOX 500, 3001 LEUVEN 1, BELGIUM. 2002, pp 33-47.
26. Schönherr, J.; Luber, M. Cuticular penetration of potassium salts: Effects of humidity, anions, and temperature. *Plant and Soil*. 2001, 236, 117-122.
27. Ferrandon, M.; Chamel, A. Foliar uptake and translocation of iron, zinc and manganese - influence of chelating-agents. *Plant physiology and biochemistry*. 1989, 27, 713-722.
28. Chamel, A.; Bougie, B. Foliar uptake of copper - studies on cuticular sorption and penetration, *Vegetal Physiology*. 1977, 15, 679-693.
29. Schönherr, J. Calcium chloride penetrates plant cuticles via aqueous pores. *Planta*. 2000, 212, 112-118.
30. Schönherr, J. Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. *J. Exp. Bot*. 2006, 57, 2471-2491.
31. Eichert, T.; Burkhardt, J. Quantification of stomatal uptake of ionic solutes using a new model system. *J. Exp. Bot*. 2001, 52, 771-781.
32. Chamel, A.; Pineri, M.; Escoubes, M. Quantitative determination of water sorption by plant cuticles. *Plant, Cell and Environment*. 1991, 14, 87-95.
33. Eichert, T.; Kurtz, A.; Steiner, U.; Goldbach, H. E. Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles. *Physiologia Plantarum*. 2008, 134, 151-160.
34. Waisberg, M.; Black, W. D.; Waisberg, C. M.; Hale, B. The effect of pH, time and dietary source of cadmium on the bioaccessibility and adsorption of cadmium to/from lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. *Ostinata*). *Food and Chemical Toxicology*. 2004, 42, 835-842.
35. Khan, S.; Aijun, L.; Zhang, S.; Hu, Q.; Zhu, Y. Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals in lettuce grown in the soils contaminated with long-term wastewater irrigation. *Journal of Hazardous Materials*. 2008, 152, 506-515.
36. DRIRE. Direction régionale de l'industrie de la recherche et de l'environnement. <http://www.drire.gouv.fr/midi-pyrenees/>.
37. Sobanska, S.; Ricq, N.; Laboudigue, A.; Guillermo, R.; Bremard, C.; Laureyns, J.; Merlin, J.C.; Wignacourt, J.P. Microchemical investigations of dust emitted by a lead smelter. *Environ. Sci. Technol*. 1999, 33, 1334-1339.
38. BAPPET-Database on ETM in vegetables. ADEME, INERIS, CNAM, INP, ENSAT,ISA.2008. <http://www.sites-pollues.developpement-durable.gouv.fr/DocumentsDiagnostics.asp#BAPPET>

39. Birkefeld, A.; Schulin, R.; Nowack, B. *In situ transformations of fine lead oxide particles in different soils. Environmental Pollution.* 2007, 145, 554-561.
40. Foy, C. D.; Chaney, R. L.; White, M. C. *The Physiology of Metal Toxicity in Plants. Annu. Rev. Plant. Physiol.* 1978, 29, 511-566.
41. Salt, D. E.; Prince, R. C.; Pickering, I. J.; Raskin, I. *Mechanisms of Cadmium Mobility and Accumulation in Indian Mustard. Plant Physiol.* 1995, 109, 1427-1433.
42. Cosio, C.; DeSantis, L.; Frey, B.; Diallo, S.; Keller, C. *Distribution of cadmium in leaves of Thlaspi caerulescens. J. Exp. Bot.* 2005, 56, 765-775.
43. Lummerzheim, M. S. *Comparative microscopic and enzymatic characterization of the leaf necrosis induced in Arabidopsis thaliana by lead nitrate and by Xanthomonas campestris pv. campestris after foliar spray. Plant, Cell and Environment.* 1995, 18, 499-509.
44. Madoz-Escande, C.; Santucci, P. *Weather-dependent change of cesium, strontium, barium and tellurium contamination deposited as aerosols on various cultures. Journal of Environmental Radioactivity.* 2005, 84, 417-439.
45. Batonneau, Y.; Bremard, C.; Laureyns, J.; Merlin, J. C. *Microscopic and imaging Raman scattering study of PbS and its photo-oxidation products. Journal of Raman Spectroscopy.* 2000, 31, 1113-1119.
46. Hirano, T.; Kiyota, M.; Aiga, I. *Physical effects of dust on leaf physiology of cucumber and kidney bean plants. Environmental Pollution.* 1995, 89, 255-261.
47. Andrews, J. H.; Harris, R. F. *The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. Annu. Rev. Phytopathol.* 2000, 38, 145-180.
48. Lindow, S. E.; Brandl, M. T. *Microbiology of the Phyllosphere. Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69, 1875-1883.
49. Choel, M.; Deboudt, K.; Flament, P.; Lecomet, G.; Perdrix, E.; Sobanska, S. *Fast evolution of tropospheric Pb- and Zn-rich particles in the vicinity of a lead smelter. Atmospheric Environment.* 2006, 40, 4439-4449.

4.2.3 Supporting information

Raman databases used for the minerals identification:

*Jobin-Yvon Horiba, Mineral Spectroscopy Server California Institute of Technology,
Pasadena, California, USA*

(http://minerals.gps.caltech.edu/files/raman/Caltech_data/index.htm)

Server of Physics, Department of the University of Parma Italy

<http://www.fis.unipr.it/~bersani/raman/raman/spettri.htm>

http://www.aist.go.jp/RIODB/rasmin/E_index.htm

<http://www.chem.ucl.ac.uk/resources/raman/index.html>

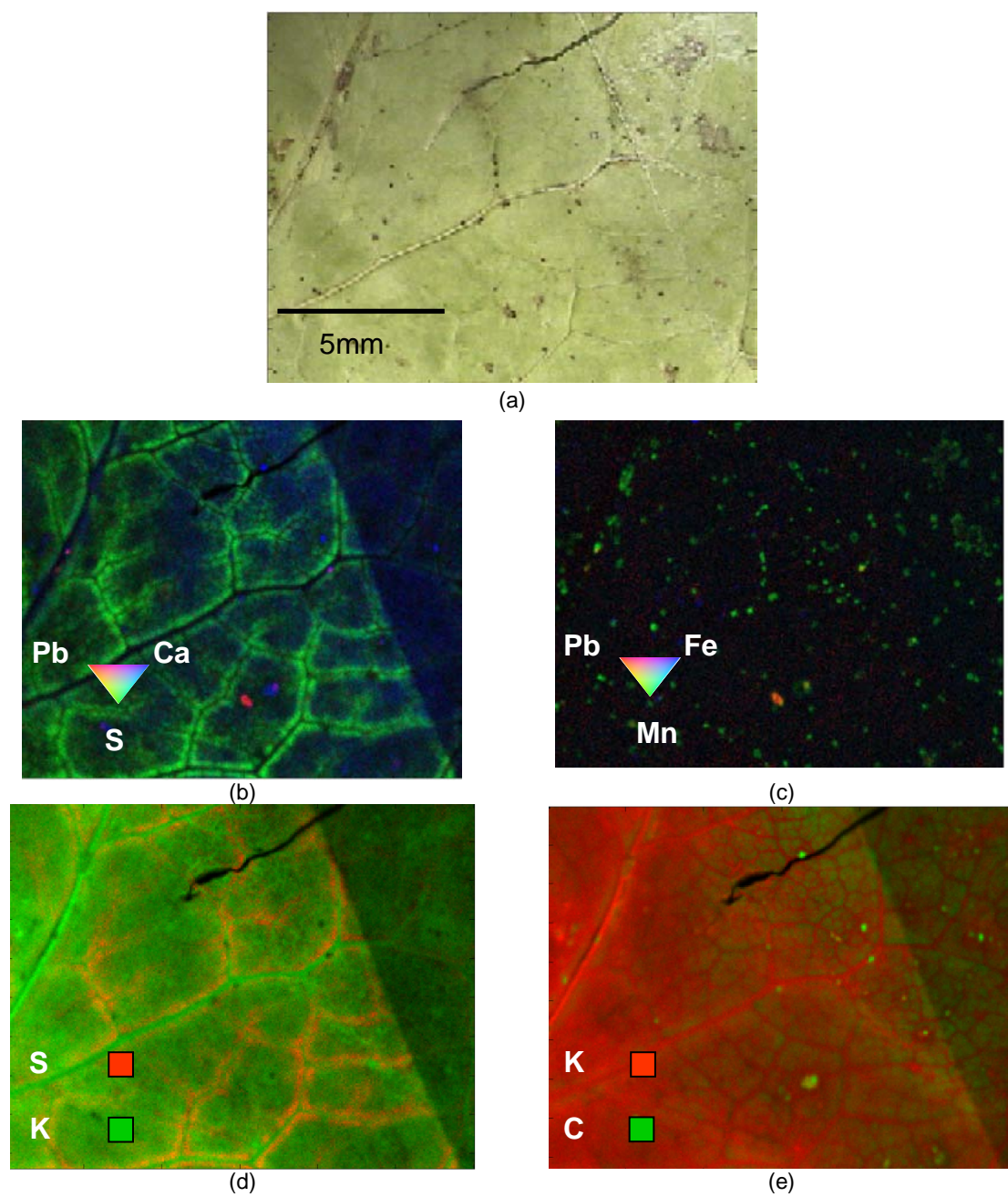


Figure S34 : (a) optical image of a part of the lettuce leaf exposed to atmospheric fallout. Dark zones correspond to necroses. (b-e) Tri color and two color μ XRF elemental maps for Ca, Pb and S (b), Fe, Pb and Mn (c), K and S (d), and Ca and K (e).

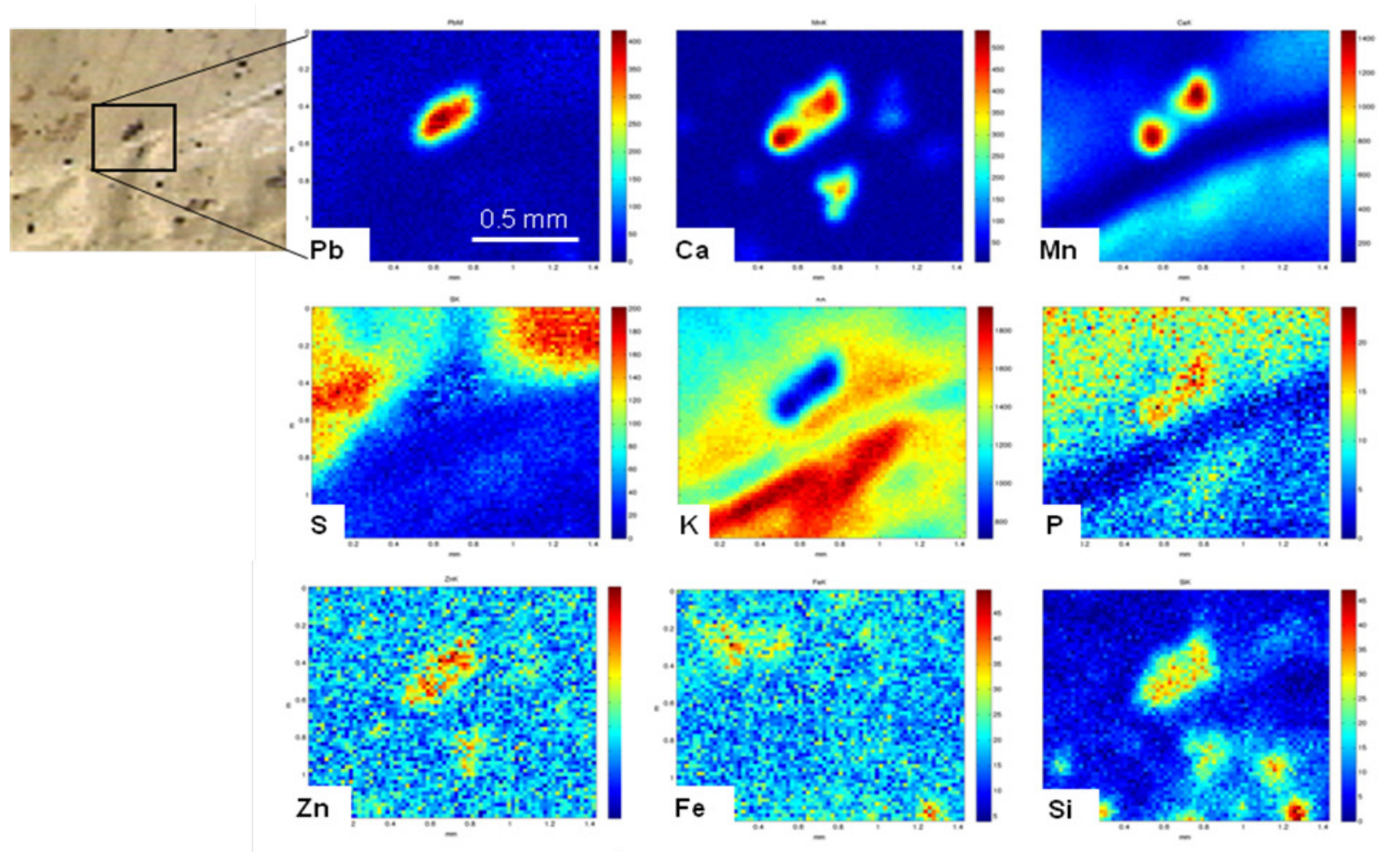


Figure S35 : μ XRF elemental maps for a Pb-rich necrosis. Ca and Mn are present in the necrosis but do not quite match Pb localization. The necrosis also contains Zn, P and Si.

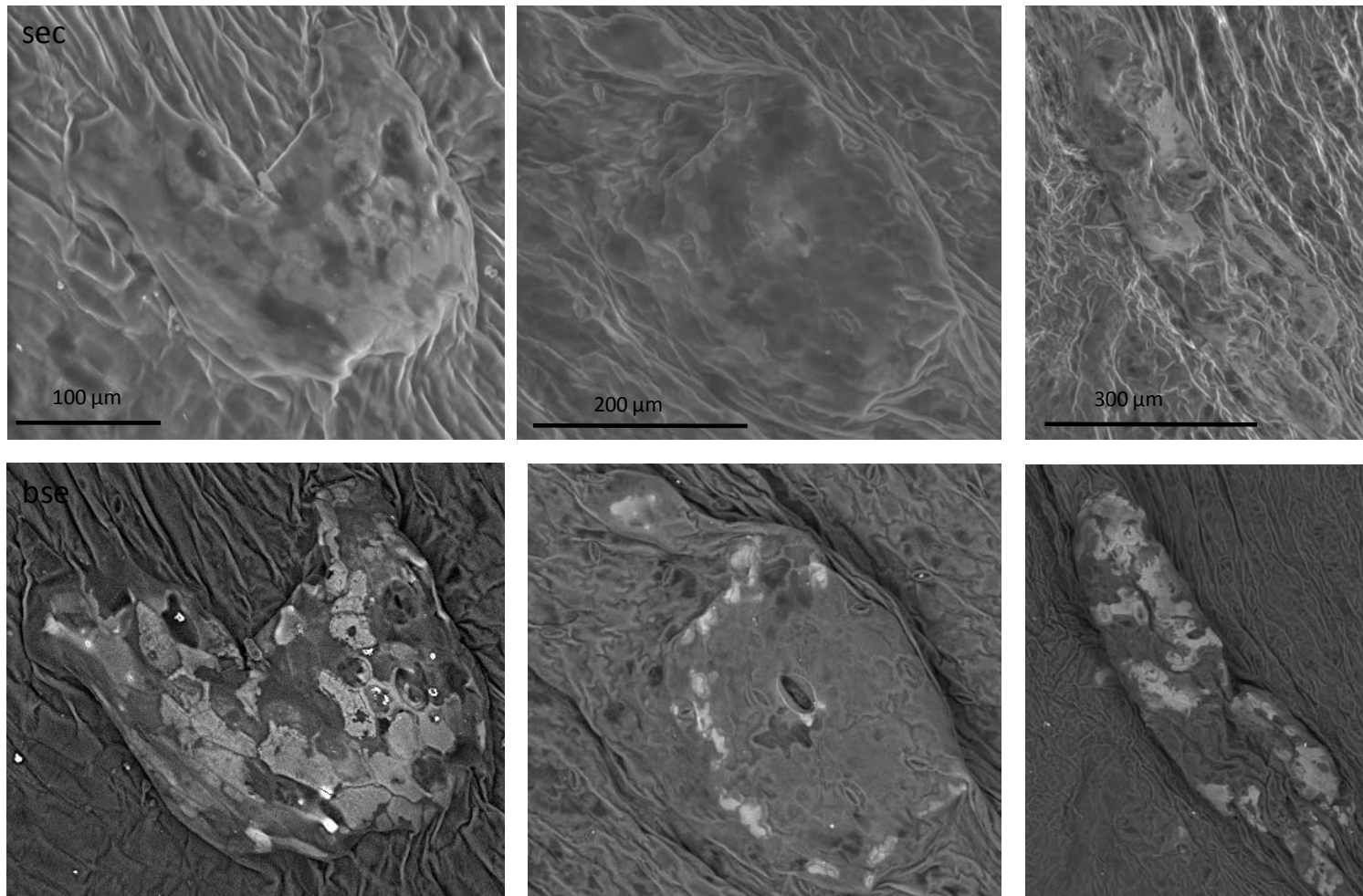


Figure S36: Secondary (top) and back scattered (bottom) electron images of necroses. Particles containing heavy elements present in the necrotic zone are covered by an organic membrane.

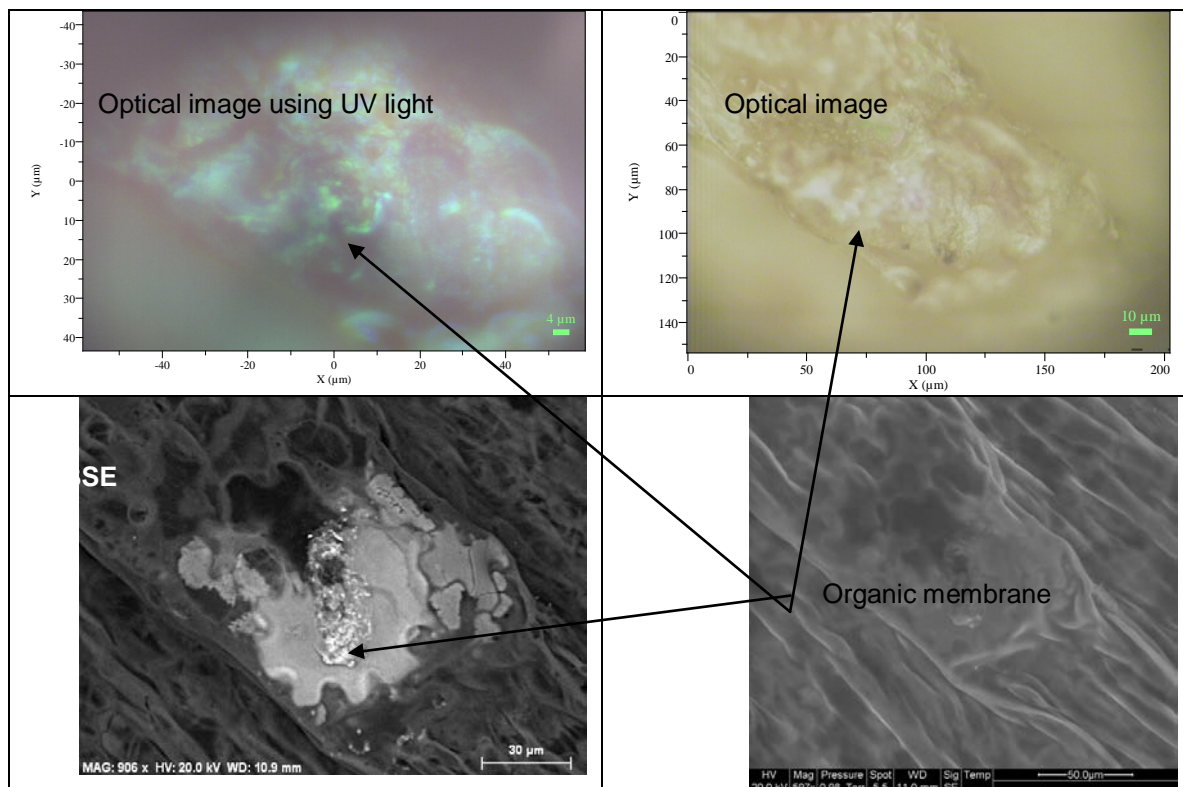


Figure S37: Organic membrane covering a necrotic zone of the leaf

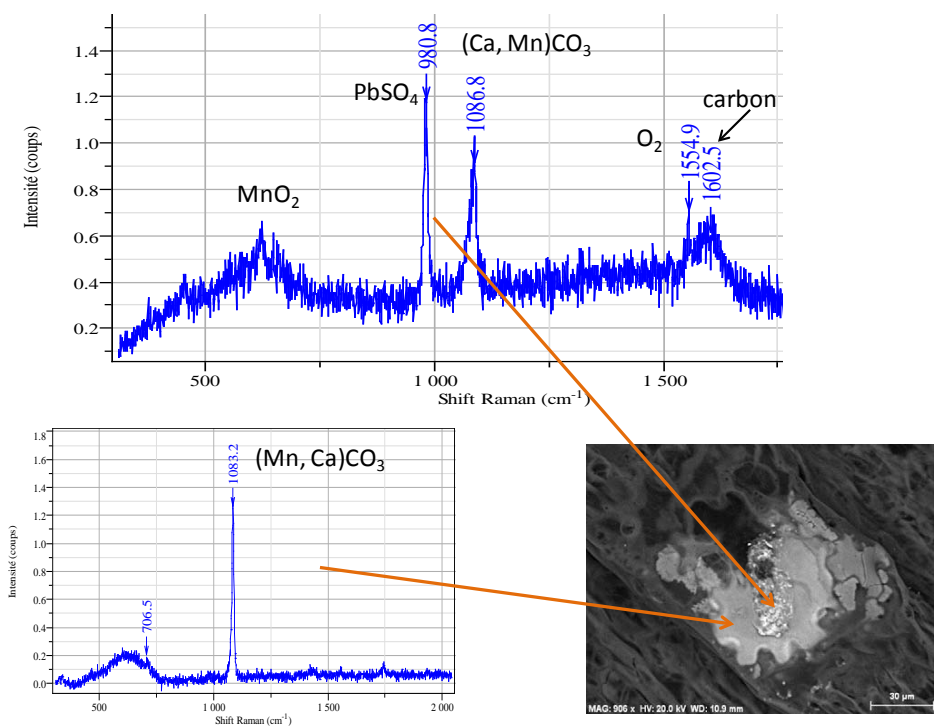


Figure S38: μRaman spectra of lead-rich and carbonate zones of a necrosis.

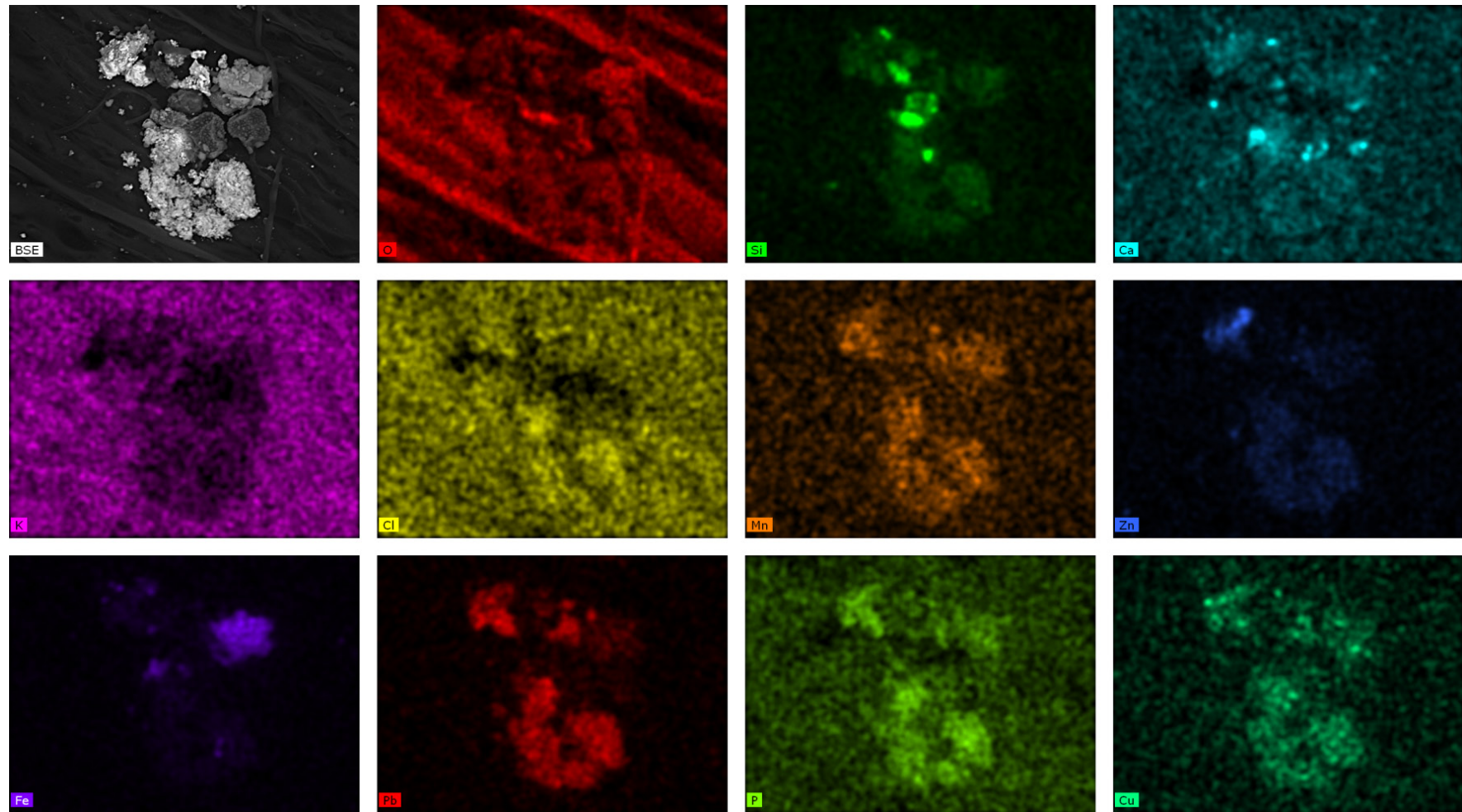


Figure S39: SEM-EDX images of particles present on the leaf surface

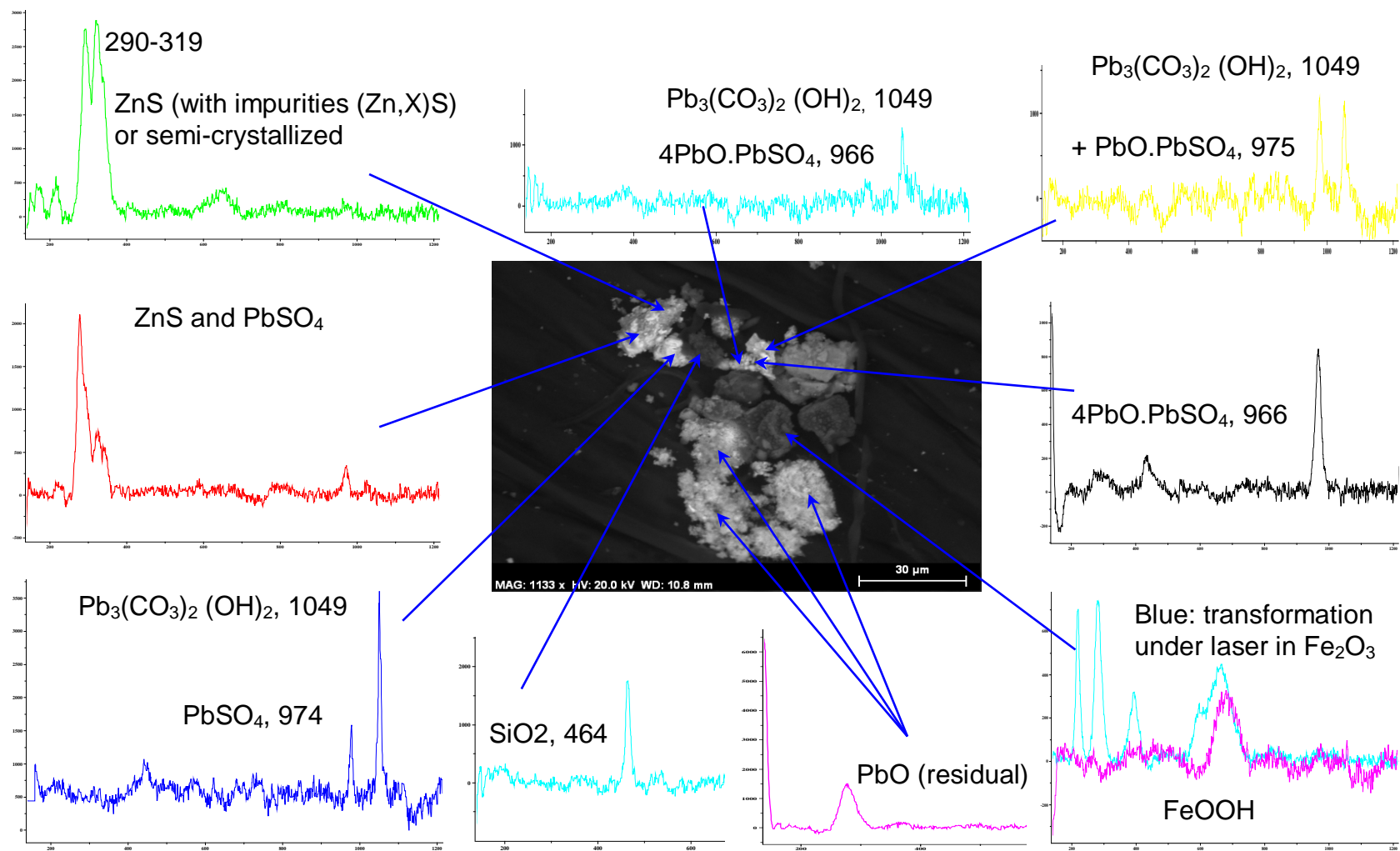


Figure S40 : μ Raman (wavelength in the visible region) ponctual spectra of the trapped particles

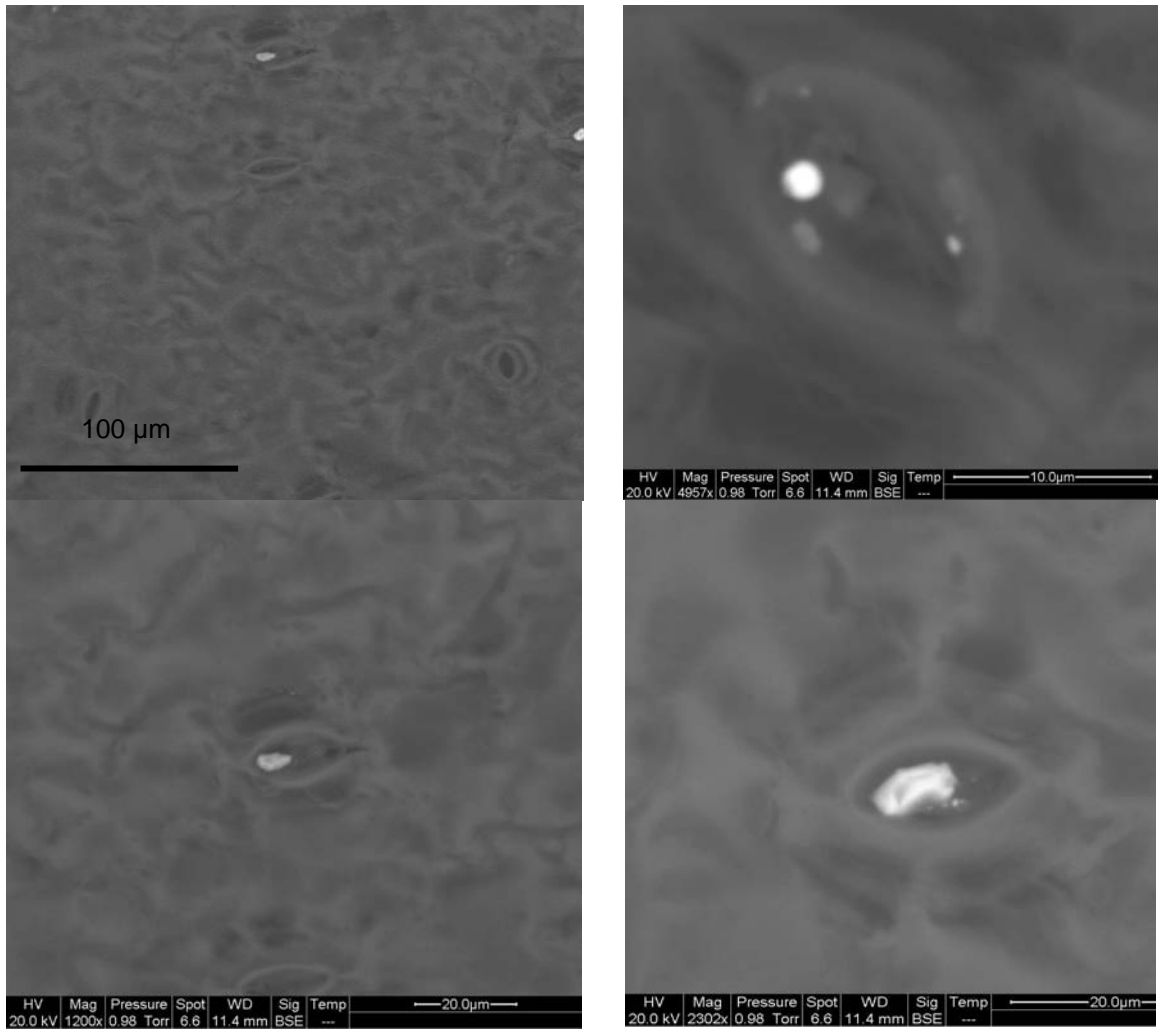


Figure S41: SEM images of stomata plugged by particles of various sizes

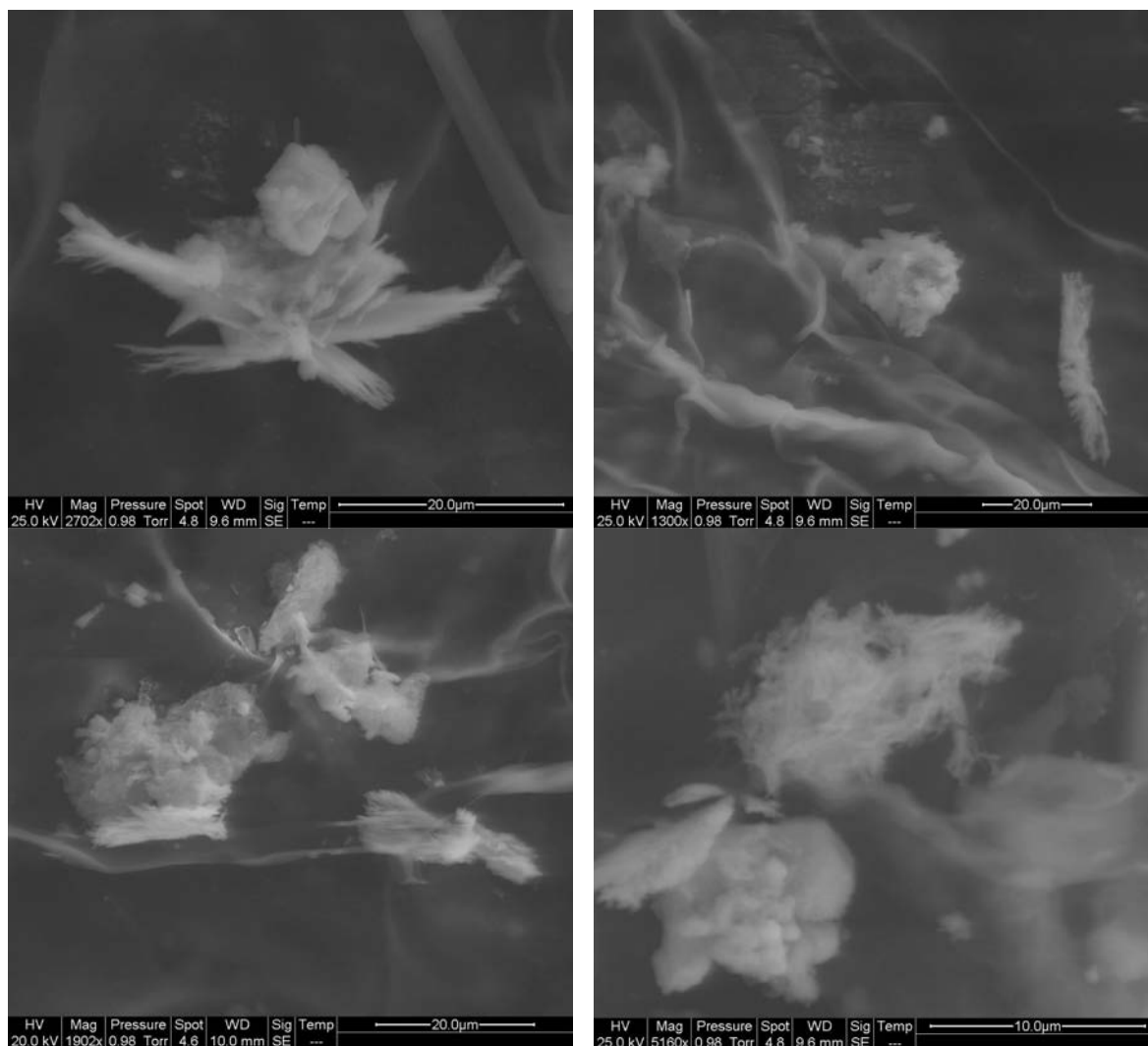


Figure S42 : SEM images of Pb-containing secondary compounds observed on the leaf surface

Chapitre 5

Transfert du plomb issu des particules vers l'homme

5.1. Transfert du plomb issu des particules vers l'homme

5.1.1 Avant-propos

Comment appréhender le risque pour la santé humaine, lié à la présence de substances toxiques dans l'environnement, et dans les ambiances de travail?

Le risque est déterminé par une synthèse des informations sur l'évaluation de l'exposition de la population considérée, et l'interprétation des relations « dose-effets » existantes. Il s'agit donc d'une combinaison de la probabilité et de la (des) conséquence(s) de la survenue d'un événement dangereux spécifié. (OHSAS 18001)

On définit le risque comme :

$$\text{Risque} = f(\text{Exposition, Danger})$$

L'exposition intègre la dose de la substance exposée, sa durée, des mesures préventives, et des méthodes de travail (efforts...).

Le danger est un paramètre qui s'échelonne de la gêne, à l'irritation, à l'intoxication, au cancer, avec des effets sur la reproduction, et pouvant aller jusqu'à la mort.

Après l'étude du transfert des particules métallurgiques riches en plomb sur les végétaux, intéressons nous à la cible humaine. Ce dernier volet de thèse, propose d'analyser l'impact toxicologique des particules émises aux différents postes de travail, et dans l'environnement. Ces travaux préliminaires présentent les effets de toxicité des particules et n'entrent pas dans la compréhension des mécanismes.

En milieu professionnel, les salariés sont potentiellement exposés aux particules de process concentrées en plomb, et autres métaux par l'inhalation et l'ingestion. Afin d'estimer les risques potentiels pour la santé, il est indispensable de déterminer l'impact des particules via ces deux voies d'exposition. Les particules les plus fines (de diamètre inférieur à 10 µm) présentes dans l'ambiance des ateliers de travail ont été visées.

Aujourd'hui, sur les sites et sols pollués, **l'ingestion de particules** et de sols reste la voie d'exposition majeure par rapport à l'inhalation ou l'absorption cutanée (Oomen et

al., 2002) (Paustenbach D. J.[1], 2000). En 1997, l'EPA (Environmental Protection Agency, USA) considérait une ingestion maximale de 50 mg de sol pour un adulte exposé avec 10% de plomb absorbé par l'organisme. Mais, dans le cas de personnes exposées **en milieu professionnel**, la principale voie d'absorption des dérivés minéraux du plomb est pulmonaire (environ 35 à 50%) sous forme de vapeurs, de poussières ou de fumées (Landrigan et Todd, 1994).

La toxicité d'une particule au niveau du système respiratoire semble être fonction non seulement de propriétés physiques intrinsèques (taille et surface spécifique) mais aussi de propriétés chimiques. Dans ce travail, nous avons testé le potentiel toxique pour l'inhalation de ces particules de manière in-vitro et acellulaire.

Largement, développées, les cultures cellulaires in-vitro donnent une indication de viabilité cellulaire et de pouvoir inflammatoire des PM.

Les tests chimiques développés aujourd'hui, se focalisent sur un paramètre en amont de l'inflammation ou de la cytotoxicité cellulaire : le stress oxydatif. Ainsi, les propriétés oxydantes des particules et leur capacité à générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS) ont été proposés comme facteurs fédérateurs pour expliquer les effets pathogènes induits par des polluants aériens (Donaldson et al., 1996, Borm et al., 2007).

En ce qui concerne l'ingestion, l'absorption a lieu via des mains et visages souillées, par le fait de fumer et de boire sur les lieux de travail ou par l'ingestion de plomb préalablement inhalé (via l'escalator muco-ciliaire). Dans l'objectif d'évaluation des risques sanitaires, outre la concentration totale des particules en plomb, il est important de connaître la fraction biodisponible du plomb. Cette dernière peut être approchée par la fraction bioaccessible (fraction du contaminant solubilisée dans le tractus gastro-intestinal). Cette dernière est considérée comme supérieure ou égale à la fraction biodisponible.

L'objectif de ce travail est d'étudier l'influence de la taille des particules de process sur leur dangerosité potentielle, estimée par les trois indicateurs suivants:

- potentiel pro-oxydant
- test in-vitro de cytotoxicité et d'inflammation sur des cellules d'épithélium pulmonaires.
- bioaccessibilité du plomb ingéré,

Ce travail contribue à l'application et à la validation des tests chimiques de mesures de du potentiel oxydant intrinsèque (*DTT*), et de bioaccessibilité (*BARGE*), qui pourraient devenir des outils d'évaluation des risques sanitaires, répondant en particulier à l'objectif du règlement européen REACH de réduire les tests de toxicité réalisés sur animaux. Ces tests chimiques ne représentent cependant qu'un des nombreux maillons indispensables, pour estimer les risques pour la santé humaine, liés aux activités de recyclage des batteries. En effet, de nombreux autres paramètres, relatifs aux conditions de travail et aux caractéristiques de la cible, entrent également en jeu. L'étude des risques professionnels, par les observations aux postes de travail par exemple, restent évidemment indispensable, et complémentaire de l'approche ciblée des caractéristiques et de la réactivité des particules, que nous avons adoptée.

Ce chapitre toxicologique est donc exploratoire et se présente sous la forme d'une publication en cours de soumission dans le journal *Chemosphere* :

Bioavailable inhaled lead and bioaccessible gastric lead : case of workplaces in a lead-recycling plant.

G. Uzu, J.J. Sauvain, M. Riediker, M. Sánchez Sandoval Hohl, A. Baeza, S. Val, K. Tack, S. Denys, J. Caboche , P. Pradere & C. Dumat.

5.1.2 Bioavailable inhaled lead and bioaccessible gastric lead : case of workplaces in a lead-recycling plant.

G. Uzu^{1,2}, JJ. Sauvain³, M. Sánchez Sandoval Hohl³, M. Riediker³, A. Baeza⁴, S. Val⁴,
K. Tack⁵, S. Denys⁵, J. Caboche⁵, P. Pradere⁶ & C. Dumat^{1,2}

¹Université de Toulouse ; UPS, INP ; EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle) ;
ENSAT, Avenue de l'Agrobiopôle, F-31326 Castanet-Tolosan, France

²CNRS ; EcoLab ; F-31326 Castanet-Tolosan, France

³IST, Institute for Work and Health, 21 rue du Bugnon, 1011 Lausanne, Switzerland.

⁴Université Paris Diderot-Paris 7, Unit of Functional and Adaptive Biology (BFA) EAC
CNRS 7059, Laboratory of Molecular and Cellular Responses to Xenobiotics, France.

⁵Ineris, parc Alata, BP 2, 60550 Verneuil-en-Halatte.

⁶STCM, Société de traitements chimiques des métaux, 30 Avenue de Fondeyre
31200 Toulouse.

Keywords : lead-recycling plant, PM₁₀, PM_{2.5}, PM₁, DTT, pulmonary epithelial cells,
oxidative stress, toxicity, bioaccessibility.

5.1.2.1 Context:

Many epidemiological and controlled exposure studies demonstrate that human exposure to particulate matter (PM) has adverse effects on health (Brook et al., 2002; 2004; Polichetti et al., 2009). They are mainly linked to lung inflammation or oxidative stress (Oberdörster et al., 2000) and depend on the PM composition, size, shapes, speciation and redox properties (Aust et al., 2002; Li et al., 2003b). Human exposure to PM is known to enhance chronic obstructive pulmonary disease characterized by an increased secretion of pro-inflammatory mediators (Takano et al., 1998) in the broncho-alveolar washing and neutrophil influx. This inflammation leads to adverse effects on cardiovascular system (Mills et al., 2009; Polichetti et al., 2009), increases atherosclerosis (Hoffmann et al., 2007; Yatera et al., 2008), and favors deep vein thrombosis (Baccarelli et al., 2007, 2008; Mutlu, 2007). Increasing evidence suggests that metals present in PM generate reactive oxygen species (ROS) leading to oxidative stress that may be involved in the production of some of the pro-inflammatory symptoms (Li et al., 2003b; Li et al., 2003a; Shukla et al., 2000; Utell et al., 2002).

Among toxic metals occurring in atmospheric PM, lead is one of the more frequently observed (Uzu et al., 2009). Lead-recycling plants are currently one of the human activities emitting lead as exhaust PM in the environment (Donisa et al., 2000). Atmospheric deposition of lead-rich PM is an important issue regarding risks following exposure for workers and people living in the surroundings of these plants; Emitted lead PM may enter the body through 3 exposure routes: inhalation, ingestion and dermal contact. The inhalation is considered as the major exposure route in adult exposure at workplaces whereas ingestion is considered as the major exposure route for children. Lead-rich particles are interesting for studying PM effects. Lead is by itself a poison. In contrast, the subject of this paper is the surface reactivity of PM and we suggest that studying the reactivity of lead can provide valuable insight into the ROS-paradigm. Primarily, adult lead poisoning results from the exposure by inhalation in the workplace. In addition to their effect on red cells, lead ions may lead to lung oxidative stress (Garçon et al., 2004; Gurer et Ercal, 2000), through perturbation of the pro-oxidant/antioxidant balance (Gurer-Orhan et al., 2004). For children, the main way of lead entrance is ingestion from environmental media (paint chips, dust or soil) (Landrigan et Todd, 1994). In the body, interaction does exist between ingestion and inhalation since inhaled lead can be secondarily ingested through the mucociliary escalator for particles. This mucociliary transport evacuates particles from the tracheo-bronchial tree to the gut by moving a mucus layer upwards through the action of ciliated epithelial cells. Once particles are in the pharynx, they

are swallowed and enter in the gastrointestinal tract (Roth, 2006; Edwards et al., 1998). Thus, the gastric bioavailable fraction may be of importance for risk evaluation. The pharmacology definition of oral bioavailability is the contaminant fraction that reaches the systemic circulation (Kelley et al., 2002). The crucial step controlling oral bioavailability is the fraction of the contaminant that is mobilized from the ingested PM into the digestive juice: the bioaccessible fraction. The contaminant matrix will affect the availability. Thus, the bioaccessibility of a metal is defined as the maximal amount of metal solubilized in a synthetic gastric fluid and therefore potentially available for uptake across the intestinal lumen. Bioaccessibility can be evaluated through in vitro models and consists in sequential extraction by digestive fluids (Oomen et al., 2002). Moreover, the development of in vitro testing is strongly asked by the REACH regulation in order to reduce animals testing. The routes of intake of lead-rich particles and impacted organs are shown in Figure 1

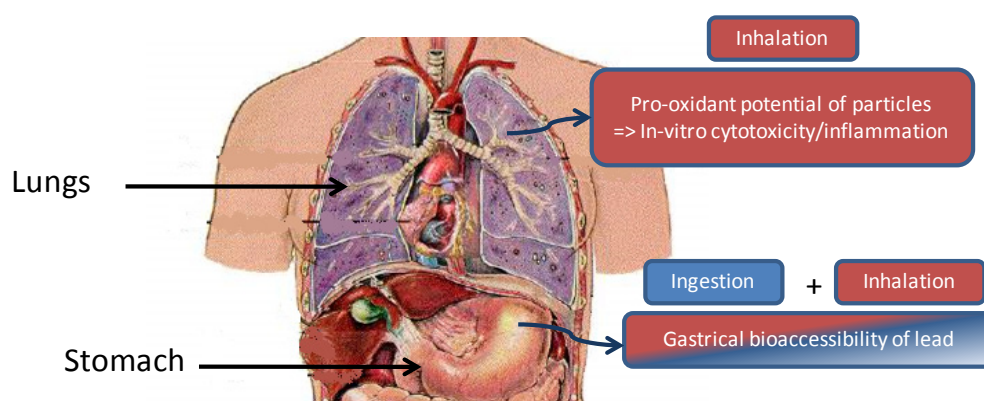


Figure 43: routes of intake of lead-rich particles and impacted organs.

Keeping in view all these considerations, the hypothesis for this study was that bioavailable lead and other metals from inhaled PM induce oxidative stress in human lung epithelial cells, leading to inflammation. We focused on the relation between intrinsic particles properties (size, speciation and oxidant potential) and their biological effect on epithelial cells (inflammation and cell death). In addition, since inhaled PM can be secondary ingested, a chemical test of gastric bioaccessibility was performed.

5.1.2.2 Material and Methods:

5.1.2.2.1 Sampling particles and characterization.

A secondary lead smelter which currently recycles batteries was chosen as a representative example of the smelter metal industry to develop a methodology to assess human health risk for industrial lead particles. We mainly focused on the sanitary risk for workers. Process and localization had been previously described (Uzu et al., 2009). Three sources of particles were identified and collected : (i) working environments of the smelter where lead pastes are processed in rotary furnaces at 1200°C (noted *Furnace PM*) , (ii) the refinery where lead is purified from unwanted metals or enriched (noted *Refining PM*) and finally, (iii) channelled emissions which are only generated by the furnace unit (noted *Emissions PM*). The particle collection, performed three months after complete cleaning of the three work units, is therefore representative of that emission period. 1 kg of particles was collected in polyethylene bags, then sealed and transferred in sealed opaque containers for transport to the laboratory. Samples were passed through a 2-mm stainless steel AFNOR sieve. Process dust was stored in a cool (4°C) dark place with Merck desiccant.

Because particles presented a great size heterogeneity, coarse ($PM_{10-2.5}$), fine ($PM_{2.5-1}$) and PM_1 were size-segregated by artificial resuspension in a Teflon bag (Batonneau et al., 2004; Young et al. 2002) and collected by impaction onto a $PM_{10/2.5/1}$ Dekati inertial impactor. The cascade impactor consists of two successive stages with aerodynamic cut-off diameters of 10, 2.5 and 1 μm when it operates at 10 L/min airflow. $PM_{10-2.5}$ present an aerodynamic diameter between 2.5 and 10 μm , whereas the $PM_{2.5-1}$ and PM_1 stages collect particles ranging from 2.5 to 1 μm and <1 μm , respectively. PM that were not-size segregated were noted PM_{tot} .

Size distribution of particles was determined by laser granulometric analyses using a Malvern Mastersizer S, which permitted particles size measurement in the range of 900 μm -0.05 μm . Dust samples were dispersed in ethanol to avoid potential hydrophobic problems and sonicated during 10 minutes. Results are the mean of ten replicates for each sample.

5.1.2.2.2 In vitro assays of cytotoxicity and inflammation.

5.1.2.2.2.1 Particles.

Stock particle suspensions for PM_{tot} , $PM_{10-2.5}$, $PM_{2.5-1}$ and PM_1 were made at a concentration of 2 mg. mL^{-1} in DMEM/F12 cell culture media (Dulbecco Modified Eagle Medium Nutrient Mix F-12, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and stored at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ until use. Before utilization, suspensions were sonicated (Induced ultrasonic probe Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France) three times for 20 s at 60 kW and diluted in cell culture medium without Ultrosor G.

5.1.2.2.2.2 Cells and Culture Conditions.

The human bronchial epithelial cell line, 16HBE14o- (a kind gift from Dr. Gruenert NIH Los Angeles, California University, USA), was grown in DMEM/F12 cell culture media supplemented with penicillin ($100 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$), streptomycin ($100 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) and fungizone ($1 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$), glutamine ($0.292 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) and Ultrosor G (UG) 2% (Biosepra; Cergy Pontoise, France). Cells were cultured on plastic material (Costar, VWR; Fontenay-Sous-Bois France) after coating with a solution containing type I collagen at $4 \text{ } \mu\text{g.cm}^{-2}$ (Vitogen, BD Laboratories, Franklin Lakes, NJ), human fibronectin at 1 mg/ml (BD Laboratories, Franklin Lakes, NJ), Bovine Serum Albumin at 1 mg/ml (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and cell culture media LHC (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Cells were maintained in an incubator at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ temperature, 5 % CO_2 , were seeded in 96 well plates at a density of 20,000 cells per well and were grown 48 h until subconfluence. They were grown for further 4 h in UG free media before treatment with particles.

5.1.2.2.2.3 WST-1 Assay.

Water soluble tetrazolium salt assay (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium; Roche Diagnostics; Mannheim, Germany) was used to evaluate the metabolic activity of the cultures cells. After 4h of culture in UG free media, cells were treated with particles in DMEM/F12 media without phenol red for further 24 hours. At the end of the exposure, culture medium was removed, cells were rinsed two times and incubated with the WST-1 reagent for 2 hours at 37°C . Finally, optic density was measured at 450 nm wavelength with the help of a plate reader (DYNEX MRX 5000, Dynatech Laboratories, Chantilly, VA). Beforehand it was confirmed that there is no interaction between the WST-1 reagent and particles.

5.1.2.2.2.4 Inflammation Assay.

After subconfluent cultures have been exposed to the particles for 24h, supernatants were recovered, centrifuged at 10,000 g for 10 minutes at 4 °C. Supernatants were frozen at -80 °C until further analysis. The concentration of granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) released into the culture supernatant was evaluated with a commercially available human ELISA Kit (R&D Systems Europe; Abingdon, UK) according to the manufacturer's recommendations.

5.1.2.2.2.5 Statistical analysis.

Data represented as mean \pm SD were evaluated by analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnet's t-test to examine the differences between the different treated groups with respect to control, whereas the Newmann–Keuls test was used to evaluate the difference among the treated groups, with $p < 0.05$ considered significant.

5.1.2.2.3 Assay of redox properties

5.1.2.2.3.1 Particle suspensions

Just prior to conducting the assay, a stock suspension of 50 mg.L⁻¹ of PM was prepared in a surfactant media Tween 80® 0.6 mg/l (Fluka BioChemika) and sonicated for 15 min at 180 W in a water bath set at 30°C (Ultrason Bransonic 5210).

5.1.2.2.3.2 DTT Assay

This assay provides a measure of the particles capacity to catalyze the electron transfer between dithiothreitol (DTT) and oxygen in a simple chemical system without cells. The procedure used is based on the one described by Cho et al. (2005) and (Sauvain et al., 2008). In a Reactitherm (Pierce, USA) with heating and stirring modules, two tubes (duplicates) containing 5 mL of DTT 100 mM in 0.1M phosphate buffer pH 7.4 and 5 mL of a particle suspension were incubated at 37C under magnetic stirring. A blank was done in parallel following the same procedure but by replacing the particle suspension with the surfactant media. At pre-defined times, ranging from 5 to 50 min, 500 μ L of the reacting mixture was sampled and the DTT oxidation quenched by adding 500 μ L of trichloroacetic acid 10%. After briefly vortexing this mixture, 2 mL of the Tris-HCl buffer pH 8.9 was added, followed by 50 μ L of DTNB 10 mM in water. The remaining DTT was reacted with DTNB, leading to the production of 5-mercapto-2-nitrobenzoic acid, whose concentration was

determined colorimetrically at 412 nm (Lambda 10, Perkin Elmer, Switzerland). All reactivity measurements were conducted with low light exposure.

5.1.2.2.3.3 Mathematical treatment

Based on the absorption value at 412 nm, the initial (at t_0 min) and remaining mass of DTT (at t_x min) can be calculated for the blank and the particle suspension. The DTT mass is a linear function of time until at least 50% DTT consumption with the slope corresponding to the DTT consumption rate. The intrinsic NP reactivity is expressed in function of the mass of the NP particle reacting with DTT (pmol of DTT consumption per minute per microgram of particle). This value is obtained by subtracting the blank consumption rate to the DTT consumption rate in the presence of particles and dividing it by the mass of particles in the reaction vessel.

5.1.2.2.3.4 Bioaccessibility assay

Bioaccessibility measurements were performed using the Barge Unified protocol (Cave et al., 2006). This test consists of a one-step extraction procedure and simulates the chemical processes occurring in the compartments mouth and stomach, using synthetic digestive solutions. The composition of these solutions is given in (Denys et al., 2009). Temperature was maintained at 37 °C throughout the extraction procedure. Particles (0.1 g) were added to 9 mL of artificial saliva (pH 6.5). This suspension was shaken for 5 min. Then 13.5 mL of gastric solution (pH 1.0) was added to the particles suspension. The pH of the solution was reduced to 1.2 using HCl (concentration: 37%)The suspension was mixed using an end-over-end rotation at 37 °C for 1 h. pH of the suspension was measured. If the pH was above 1.7, it was decreased by adding HCl (concentration 37%) until being in the range 1.2–1.7. Then, the stomach phase was extracted by centrifuging the suspension at 3000 g for 5 min and Pb concentration in the solution was then measured by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES; Jobin Yvon). Bioaccessibility test was carried out on all PM samples and one reference material. Results of bioaccessibility are expressed as the percentage of the total Pb content in particles. For each sample, three replicate tests were carried out.

5.1.2.3 Results and discussion.

5.1.2.3.1 Particles characterization :

5.1.2.3.1.1 Granulometric distribution

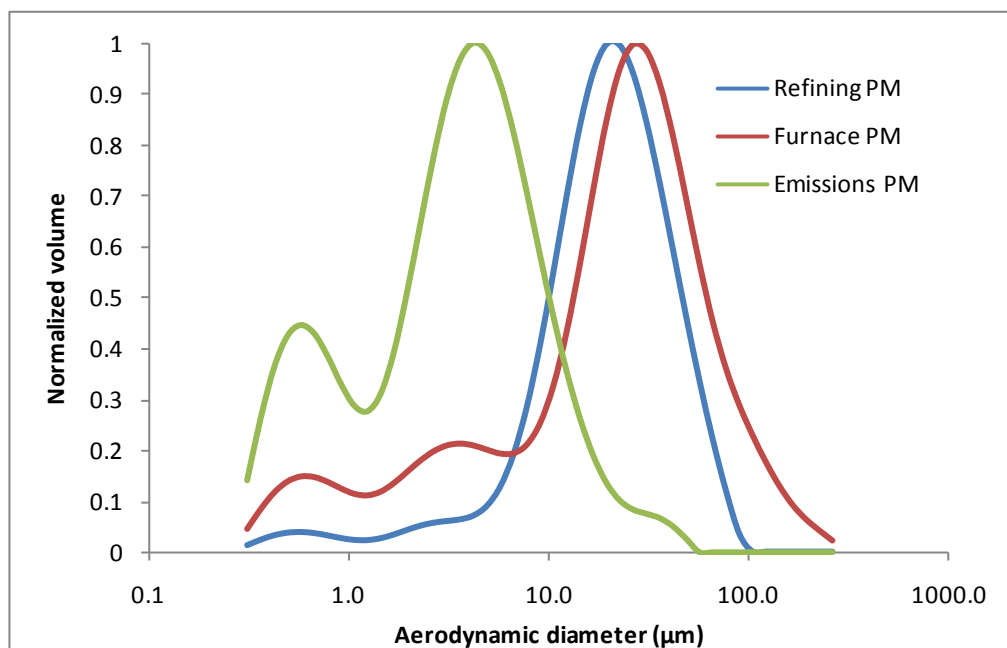


Figure 44: Average size distribution of particles from the three different origins ($n=10$ for each origin).

At all sampling locations, the particles showed a large distribution of the particle size between 0.1 and 300 μm (Figure 2). **Significant differences were observed between workplaces and channelled emissions.** Working places (*Refining PM* and *Furnace PM*) presented a main amount of $>10 \mu\text{m}$ particles, whereas the *Emissions PM* had a majority of fine particles. At working places, *Refining PM* presented a Gaussian distribution with a mean diameter of $21.4 \pm 0.5 \mu\text{m}$, whereas the distribution of *Furnace PM* was trimodal (mean diameter $24.6 \pm 0.6 \mu\text{m}$). *Emissions PM* presented a bimodal distribution involving two main PM populations, where $\text{PM}_{10-2.5}$ accounted for 50 %, $\text{PM}_{2.5-1}$ 20% and PM_1 21%; for the ten samples, the mean diameter was $3.87 \pm 0.8 \mu\text{m}$. Inhalable fraction (e.g less than 10 μm for diameter) represented 20%, 27% and 90% for *Refining PM*, *Furnace PM*, *Emissions PM*, respectively.

5.1.2.3.1.2 Lead concentrations:

Regardless of the source of emission and size, all particles contained extremely high levels of Pb (25 to 45% dry weights, Table 9 : lead concentration in process particles according to their size. * Significant differences among fractions $PM_{tot/10/2.5}$ ($p < 0.01$, $n=3$)). Because of insufficient quantities, PM_1 were not analyzed. **No general trend can be highlighted as a function of the size, however lead concentration of $PM_{10-2.5}$ and $PM_{2.5-1}$ are significantly different from bulk particles (PM_{tot}) and at furnace coarse and fine fractions are significantly enriched with lead compared to PM_{tot} .**

Sample contents ($g.kg^{-1}$) $\pm 7\%$	Emissions			Refining			Furnace		
	PM_{tot}	$PM_{10-2.5}$	$PM_{2.5-1}$	PM_{tot}	$PM_{10-2.5}$	$PM_{2.5-1}$	PM_{tot}	$PM_{10-2.5}$	$PM_{2.5-1}$
Pb	334	267*	273*	413.3	321*	323*	257	452*	380**

Table 9 : lead concentration in process particles according to their size. * Significant differences among fractions $PM_{tot/10/2.5}$ ($p < 0.01$, $n=3$)

5.1.2.3.2 Inherent redox reactivity of PM

The intrinsic ability of PM to catalyse the oxidation of a reducing compound (DTT $E_0 = -0.33$ V) by oxygen was assessed with the DTT assay. Figure 3 presents DTT consumption rate measured for the different fractions of particles studied.

The negative values obtained are due to the blank subtraction and indicate that the DTT oxidation in the absence of PM is faster than when PM is present. We speculate that such a phenomenon could be due to the combined effect of dissolution followed by Pb^{2+} complexation by DTT. Indeed, preliminary results indicate that the fraction of PM $> 10 \mu m$ from *Emission* and *Refining* present a solubility of $4.1 \pm 0.9\%$ and $2.2 \pm 0.5\%$ respectively in the reactivity medium ($pH = 7.4$).

The DTT consumption rate does not appear to be function of the particle size. For PM_{tot} , Refining and Furnace PM present close reactivity: similar values for bulk particles (PM_{tot} : -9.8 and $-10,0$ $\mu mol DTT.min^{-1}.\mu g^{-1}$, respectively) whereas Emissions PM reactivity is distinct with PM_{tot} showing the highest values among these three

sources ($-12.1 \text{ pmol DTT} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$). These results suggest that a higher biological response is expected from *Emissions PM* and that this response could be driven by either Pb^{2+} ions or, if the Pb-form present is not easily soluble, through the large surface relative to the mass.

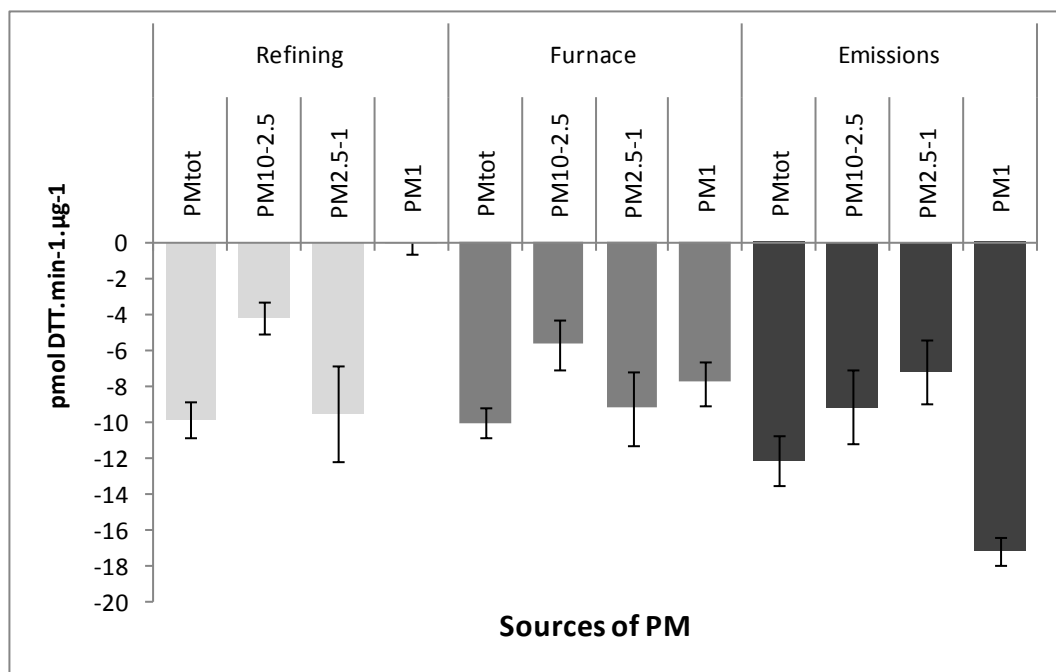


Figure 45 : DTT consumption in $\text{pmol DTT} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ for the different particles suspensions in Tween 80@ 0.6 mg/L

5.1.2.3.3 In-vitro essay of cytotoxicity

A WST-1 assay was performed to determine whether Refining, Furnace, Emissions PM exhibit cytotoxicity for 16HBE14o- cells exposed for 24 h to PM from 0 to $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Figure 46). The response was function of the working place:

Whatever the size of particles, Refining PM didn't induce cytotoxicity for none of the tested concentrations.

Furnace $\text{PM}_{2.5-1/1}$ induced cytotoxicity on 16HBE cells only for fine and PM_1 fraction, for high concentrations (50 and $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Emissions PM induced a cytotoxicity at $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ on 16HBE cells after 24H of exposure for all size fractions studied.

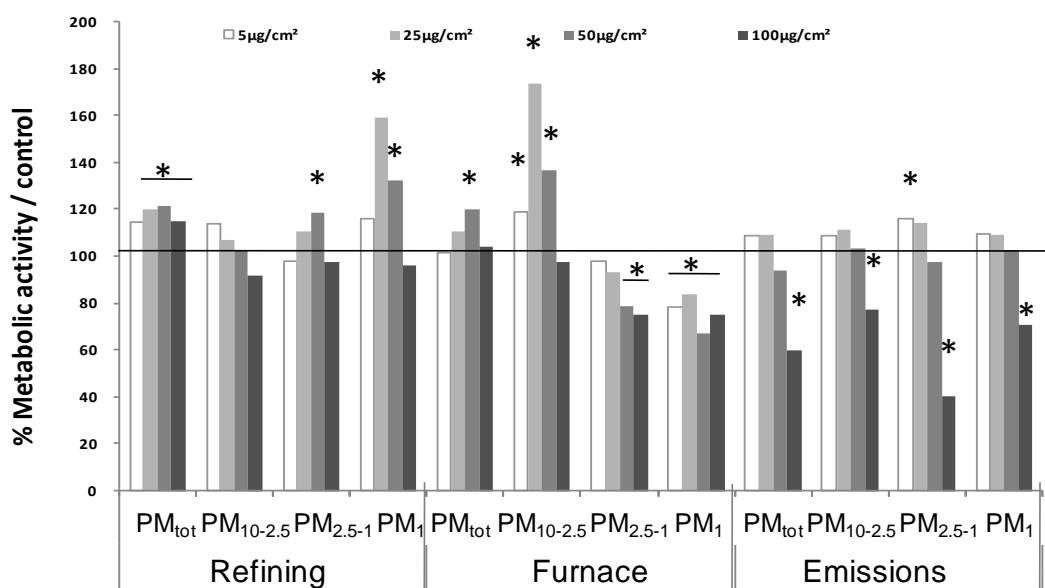


Figure 46: Cytotoxic potential of Emissions, Refining and Furnace PM.

5.1.2.3.4 Pro-inflammatory response to PM

The most often observed short-term effect of human exposure to PM is an airway inflammation, characterised by an increased secretion of pro-inflammatory mediators such as granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) (Takano et al., 1998), (Ramgolam et al., 2008). The pro-inflammatory response induced by PM was investigated by GM-CSF expression at the level of secreted proteins on 16HBE cells (Figure 47). With all PM, there was a trend of dose-dependent increase of GM-CSF release which mean airway inflammation. At the PM concentration of 5 µg/cm², regardless of PM source, PM₁ presented the most important fold induction. **Considering the finest PM (PM_{2.5-1} and PM₁), the most prone to interact with bronchial cells, Emissions PM show a higher pro-inflammatory response than Refining and Furnace PM at non cytotoxic concentrations.**

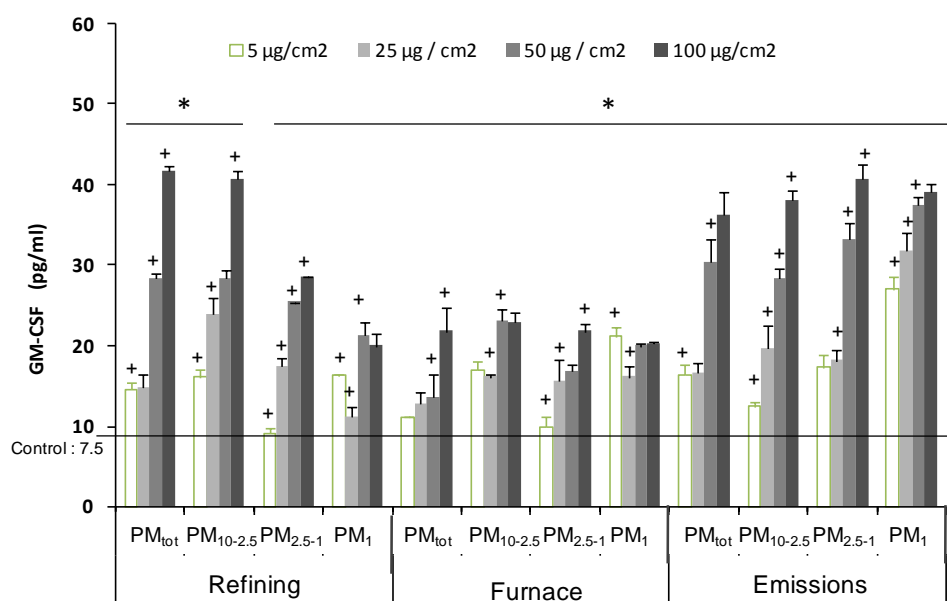


Figure 47: Pro-inflammatory potential of PM on 16HBE cells. GM-CSF, production was evaluated after treating 16HBE14o- cells with PM for 24 h at 5, 25, 50, or 100 µg cm⁻². Secreted cytokines were assessed by ELISA. Data are represented as mean of 3 wells ± SD. * statistically different from control p < 0.05, + statistically different among the treated groups, p < 0.05

5.1.2.3.5 Bioaccessibility

Figure 6 below presents lead gastric bioaccessibility values for particles samples (PM_{tot/2.5-1}); quantities of available PM₁₀₋₁ and PM₁ were not enough to perform the bioaccessibility test. Among different sources of particles, percentages of soluble lead in gastric fluids (pH~2) ranged from 10 to 15% for PM_{tot} and 15 to 27% for PM_{2.5} (Figure 6). Moreover, we noticed that lead bioaccessibility was function of the sampling site and highest values were obtained for thinnest fraction tested (PM_{2.5-1}). *Refining PM* and *Emissions PM* presented the highest bioaccessible fraction and sources can be organized into a hierarchy as following: **Refining PM > Emissions PM > Furnace PM**. However, if considering the bioaccessibility per total surface area (Figure 7) solubility of PM_{2.5} is dependent of surface area rather than composition.

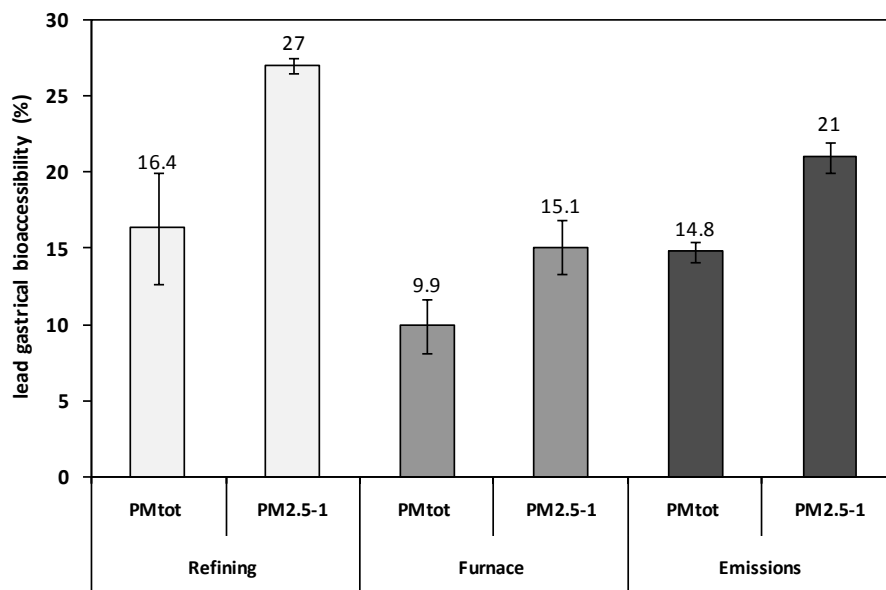


Figure 48: lead gastric bioaccessibility values for particles samples ($PM_{tot/2.5-1}$). (results expressed as the percentage of the total lead content)

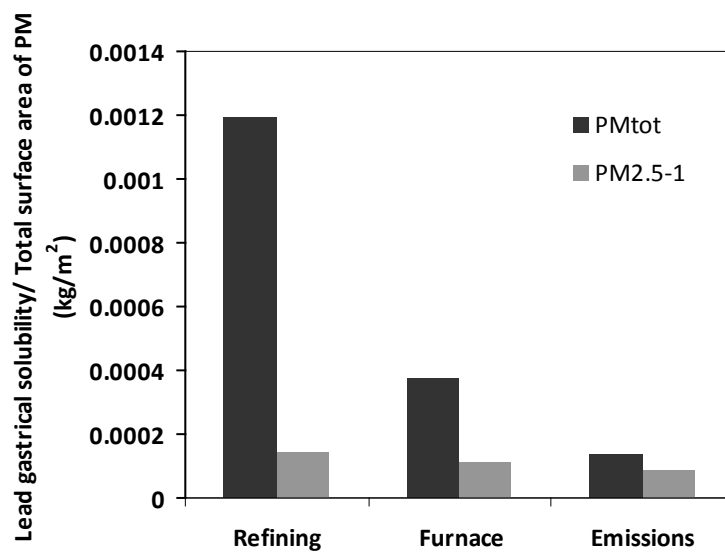


Figure 49: lead gastric bioaccessibility expressed as the total surface area of particles samples ($PM_{tot/2.5-1}$). Role of PM size and oxidative stress in pro-inflammatory response.

5.1.2.3.6 Role of PM size and oxidative stress in pro-inflammatory response

Experimental data was subjected to correlation analysis.

First, the influence of size on the release of GM-CSF was tested. Figure 49 presents the release of GM-CSF in the cell culture medium at the concentration of $5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in function of the aerodynamic diameter of PM. No linear correlation was observed between these two parameters and same trends were observed for other tested concentrations ($25\text{-}50\text{-}100\mu\text{g}/\text{cm}^2$). However it reveals that the highest effect is always observed with the finest PM.

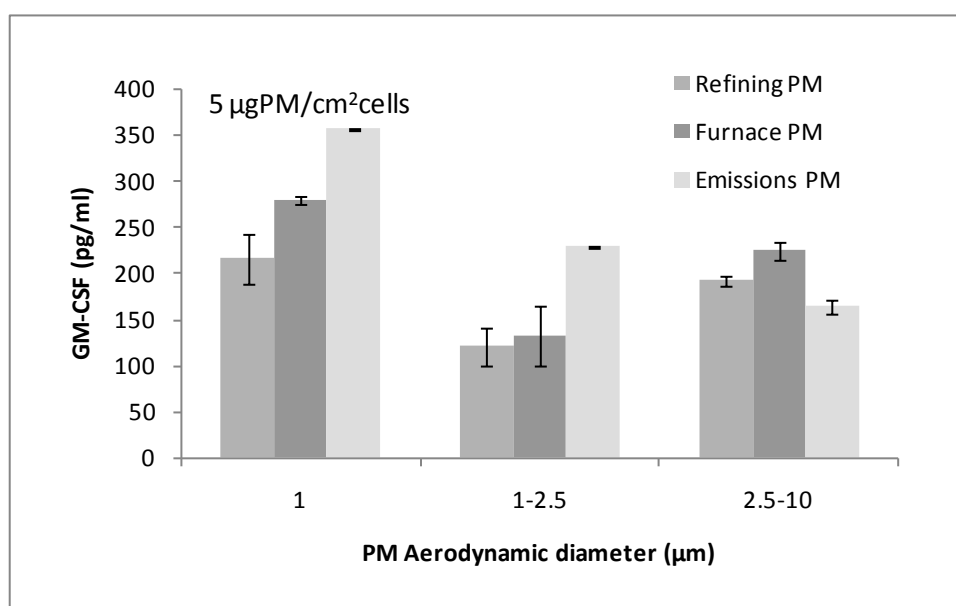


Figure 50: Secretion of GM-CSF at $5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in function of PM size.

The influence of the size on the DTT reactivity was investigated. Considering the same PM fraction, we observe that DTT reactivity decreases from Refining to Furnace and to Emission for PM_1 and $\text{PM}_{2.5-10}$ (Figure 50). On the contrary, $\text{PM}_{1-2.5}$ reactivity is very similar for the three working places. Such differences could be due to different chemical composition or particle morphology.

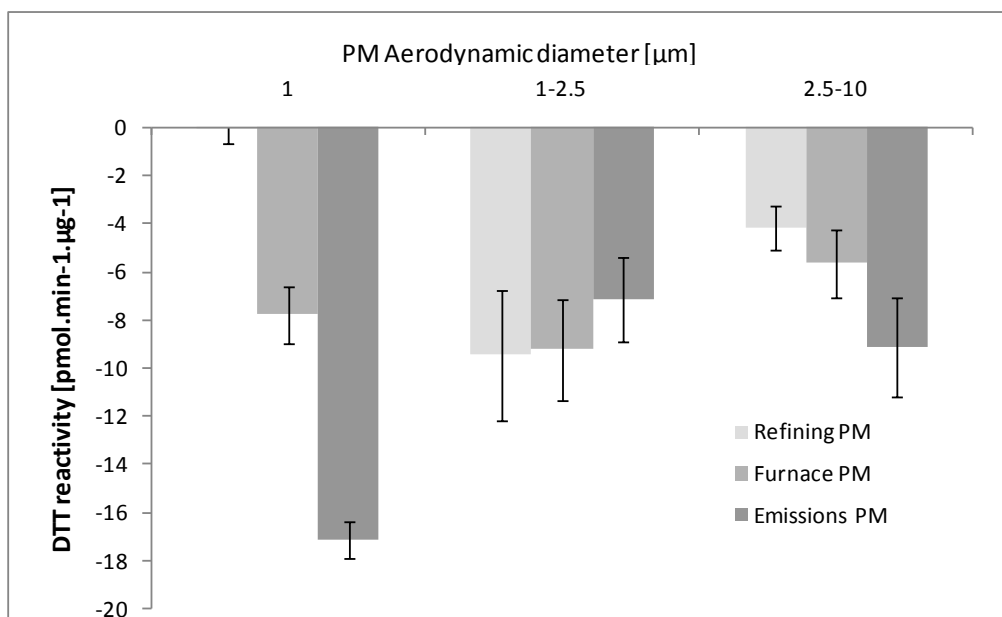


Figure 51: DTT reactivity at 5 µg/cm² in function of PM size.

Then the correlation between pro-inflammatory response and reactivity of PM was studied. (Figure 51) shows the correlations between pro-inflammatory response and reactivity of PM₁ from the different sources (Refining, Furnace and Emissions) towards DTT for all tested concentrations. Inflammation and inherent DTT reactivity were well correlated for 5 and 25 µg/cm² (R²=1 and 0.95, respectively) but not for upper exposure concentrations. Same trends were observed for PM_{2.5} with R²=1, 0.80 for 5 and 25 µg/cm² respectively. PM₁₀ showed the relation only at 5 µg/cm² (R²=0.8). Such a linear relation suggests that the particles fractions which dissolve the most (highest negative DTT values), induce the highest release of inflammatory cytokines (GM-CSF). At high concentrations (50-100 µg/cm²), such linear relation does not exist because, GM-CSF release is modified at cytotoxic concentrations (50 µg/cm² was cytotoxic for *Furnace PM*₁ and 100 µg/cm² was cytotoxic for all PM₁).

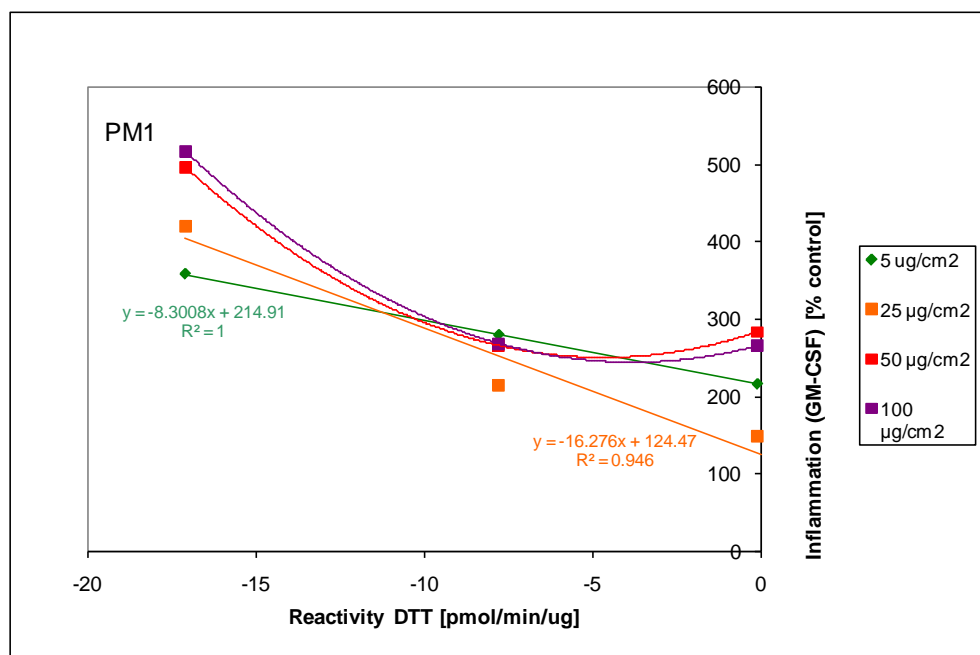


Figure 52: correlation for PM_1 of all sources (Refining, Furnace, Emissions) between pro-inflammatory signal (GM-CSF) and ROS-signal (DTT assay) for 3 sites, each with 3 samples per site; $r^2 = 1-0.95$ for 5-25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, not significant for 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

5.1.2.4 Discussion

There have been concerns about the adverse effects of PM on the human health (Polichetti et al., 2009); (Li et al., 2003a). Relevant parameters for the inflammatory effects induced by PM have been discussed and there is growing awareness that oxidative stress plays a key role in the induction of airway inflammation (Nel et al., 2001);(Li et al., 2003b).

Tested concentrations were relevant for PM exposures. In the surveyed working environment, PM concentrations in the air are up to 200 $\mu\text{gPM}/\text{m}^3$ in the refining unit and 500 $\mu\text{gPM}/\text{m}^3$ in the furnace unit. According to in-vitro and in-vivo PM dosimetry equivalences calculated by (Li et al., 2003a), 500 $\mu\text{gPM}/\text{m}^3$ corresponded to the in vitro dose range of 0.2–150 $\mu\text{gPM}/\text{cm}^2$.

5.1.2.4.1 DTT reactivity of particles and pro-inflammatory response.

Pro-inflammatory response and inherent mass based DTT reactivity were correlated at low concentrations, whereas no relation was found between size and inflammation. In the studies concerning atmospheric PM, an increasing inherent oxidative capacity is found when size decreases from coarse (2.5–10 μm), to fine (< 2.5 μm), and to

ultrafine ($< 0.1 \mu\text{m}$) (Cho et al., 2005; Li et al., 2003b). However, these atmospheric PM most often has an organic composition (high organic carbon and polycyclic aromatic hydrocarbon) whereas PM in this study is mainly inorganic with high metallic levels. (Hussain et al., 2009) and (Sauvain et al., 2008) compared nanoparticles of organic species (carbon black, CB) and metallic oxide (titanium dioxide, TiO_2) of different sizes with the DTT assay. For both studies, the inherent oxidative capacity was size-dependent for CB but not for TiO_2 which is in agreement with our results on metallic species.

Negative DTT reactivity values (Figure 3) are interpreted as an inhibition of DTT oxidation. Sauvain et al., (2009) proposed that metallic particles formed complexes with DTT, which then protected DTT from oxidation. In the case of lead, DTT can form complexes directly with the particles but also with free ionic lead Pb^{2+} after (partial) dissolution of the particles. It is known that metallic ions can complex DTT in a strong manner (Krezel et al., 2001). Also complexation with metal-ions could hinder DTT-oxidation. A preliminary test showed that a slight dissolution was taking place in the DTT media, corresponding to about $4 \pm 1\%$ for *Refining PM_{tot}* which could allow complexations mentioned previously. Experiments are going on to determine solubility of each fraction of every source so as to correlate or not negative reactivity values and solubility.

We propose that the more soluble the particles are in DTT media, the more complexed species Pb-DTT will be observed, stabilizing by this way DTT against oxidation. In this case, *Emissions PM* could generate the most amount of Pb^{2+} in solution with physiologically pH (7.4). As lung lining fluids / media for cell culture have such a pH, the results suggest that the higher inflammatory and cytotoxicity for the *Emissions PM* could result from a Pb^{2+} chemical toxicity and not necessarily from a ROS-mediated particulate effect.

5.1.2.4.2 Lungs inflammation and gastric bioaccessibility

The highest pro-inflammatory responses were observed for *Refining PM* and *Emissions PM*. Highest gastric bioaccessibility were also observed for these two samples. These effects were neither correlated with Pb contents (which are similar among all samples), nor morphology (which is sharply diverse for these two samples: nano and microspheres for *Emissions PM* and irregular features for *Refining PM*).

5.1.2.5 Conclusion:

PM samples differ by their granulometry distribution, their shapes but are quite similar concerning total lead concentrations. No size effect was noticed concerning lung inflammation (GM-CSF) but gastric bioaccessibility was the more important for the smallest tested particle size fraction. For an environmental and occupational point of view, the *Refining* and *Emissions* particles seems to be the most of concern, due to their clear pro-inflammatory (GM-CSF) effect. This effect could be at least in part due to lead-solubility.

Smallest particles have the largest surface relative to the particle mass, which will speed up the dissolution of the particles

Experts agree concerning the interest of settling diverse in-vitro tests to characterize complex particles (Ridgway, 2009). In the case of multi-metallic process particles, numerous parameters such as concentration, solubility and surface area can influence their reactivity. General trends remain difficult to exhibit. Synergy or antagonistic effects can occur such as complexes, recombination leading to new species more or less soluble than first. Finally, the understanding of how the different factors influence the toxicity still unknown.

The objective of this work was to study the pro-inflammatory response of inhaled particles and the bioaccessibility of ingested particles from a secondary lead smelter process. It tested the applicability of two chemical tests (DTT assay and BARGE protocol), which were found to be promising tools for the evaluation of the potential health hazards. Such tests could be useful in the frame of the European REACH legislation which recommends limiting in-vivo studies.

5.1.2.6 Bibliography

- Aust, A.E., J.C. Ball, A.A. Hu, J.S. Lighty, K.R. Smith, A.M. Straccia, J.M. Veranth, et W.C. Young. 2002. Particle characteristics responsible for effects on human lung epithelial cells. *Res Rep Health Eff Inst.* (110): 1-65; discussion 67-76.
- Baccarelli, A., A. Zanobetti, I. Martellini, P. Grillo, L. Hou, S. Giacomini, M. Bonzini, G. Lanzani, P.M. Mannucci, P.A. Bertazzi, et J.J. Schwartz. 2007. Effects of exposure to air pollution on blood coagulation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 5(2): 252-260.
- Baccarelli, A., I. Martinelli, A. Zanobetti, P. Grillo, L. Hou, P.A. Bertazzi, P.M. Mannucci, et J. Schwartz. 2008. Exposure to Particulate Air Pollution and Risk of Deep Vein Thrombosis. *Arch Intern Med.* 168(9): 920-927.
- Borm, P.J.A., F. Kelly, N. Kunzli, R.P.F. Schins, et K. Donaldson. 2007. Oxidant generation by particulate matter: from biologically effective dose to a promising, novel metric. *Occup Environ Med.* 64(2): 73-74.
- Brook, R.D., J.R. Brook, B. Urch, R. Vincent, S. Rajagopalan, et F. Silverman. 2002. Inhalation of Fine Particulate Air Pollution and Ozone Causes Acute Arterial Vasoconstriction in Healthy Adults. *Circulation.* 105(13): 1534-1536.
- Brook, R.D., B. Franklin, W. Cascio, Y. Hong, G. Howard, M. Lipsett, R. Luepker, M. Mittleman, J. Samet, S.C. Smith, et I. Tager. 2004. Air Pollution and Cardiovascular Disease: A Statement for Healthcare Professionals From the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation.* 109(21): 2655-2671.
- Cave, M., J. Wragg, B. Klinck, C. Grön, T. Oomen, Van de Wiele, T, I. Ollson, K. Koch, N. Reimer, N. Basta, K. Tack, et S. Casteel. 2006. Preliminary assessment of a unified bioaccessibility method for Arsenic in soils. Dans *International conference in Epidemiology and Environmental Exposure.* Paris
- Cho, A.K., C. Sioutas, A.H. Miguel, Y. Kumagai, D.A. Schmitz, M. Singh, A. Eiguren-Fernandez, et J.R. Froines. 2005. Redox activity of airborne particulate matter at different sites in the Los Angeles Basin. *Environmental Research.* 99(1): 40-47.
- Denys, S., K. Tack, J. Caboche, et P. Delalain. 2009. Bioaccessibility, solid phase distribution, and speciation of Sb in soils and in digestive fluids. *Chemosphere.* 74(5): 711-716.
- Donaldson, K., P.H. Beswick, et P.S. Gilmour. 1996. Free radical activity associated with the surface of particles: a unifying factor in determining biological activity? *Toxicology Letters.* 88(1-3): 293-298.
- Donisa, C., R. Mocanu, E. Steinnes, et A. Vasu. 2000. Heavy Metal Pollution by Atmospheric Transport in Natural Soils from the Northern Part of Eastern Carpathians. *Water, Air, & Soil Pollution.* 120(3): 347-358.
- Edwards, D.A., A. Ben-Jebria, et R. Langer. 1998. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. *J Appl Physiol.* 85(2): 379-385.
- Garçon, G., B. Leleu, F. Zerimech, T. Marez, J. Haguenoer, D. Furon, et P. Shirali. 2004. Biologic markers of oxidative stress and nephrotoxicity as studied in biomonitoring of adverse effects of occupational exposure to lead and cadmium. *J. Occup. Environ. Med.* 46(11): 1180-1186.
- Gurer, H., et N. Ercal. 2000. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radical Biology and Medicine.* 29(10): 927-945.
- Gurer-Orhan, H., H.U. Sabir, et H. Ozgünes. 2004. Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. *Toxicology.* 195(2-3): 147-154.
- Hoffmann, B., S. Moebus, S. Mohlenkamp, A. Stang, N. Lehmann, N. Dragano, A. Schmermund, M. Memmesheimer, K. Mann, R. Erbel, K. Jockel, et for the Heinz Nixdorf Recall Study Investigative Group. 2007. Residential Exposure to Traffic Is Associated With Coronary Atherosclerosis. *Circulation.* 116(5): 489-496.

- Hussain, S., S. Boland, A. Baeza-Squiban, R. Hamel, L.C. Thomassen, J.A. Martens, M.A. Billon-Galland, J. Fleury-Feith, F. Moisan, J. Pairon, et F. Marano. 2009. Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: Role of particle surface area and internalized amount. *Toxicology*. 260(1-3): 142-149.
- Kelley, M., S. Brauning, R. Schoof, et M. Ruby. 2002. *Assessing Oral Bioavailability of Metals in Soil*, Battelle Press.
- Landrigan, P.J., et A.C. Todd. 1994. Lead poisoning. *West. J. Med.* 161(2): 153-159.
- Li, N., M. Hao, R.F. Phalen, W.C. Hinds, et A.E. Nel. 2003a. Particulate air pollutants and asthma: A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. *Clinical Immunology*. 109(3): 250-265.
- Li, N., C. Sioutas, A. Cho, D. Schmitz, C. Misra, J. Sempf, M. Wang, T. Oberley, J. Froines, et A. Nel. 2003b. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect.* 111(4): 455-460.
- Mills, N.L., K. Donaldson, P.W. Hadoke, N.A. Boon, W. MacNee, F.R. Cassee, T. Sandström, A. Blomberg, et D.E. Newby. 2009. Adverse cardiovascular effects of air pollution. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 6(1): 36-44.
- Mutlu, G.M. 2007. Ambient particulate matter accelerates coagulation via an IL-6-dependent pathway. *J Clin Invest.* 117(10): 2952-2961.
- Nel, A.E., D. Diaz-Sanchez, et N. Li. 2001. The role of particulate pollutants in pulmonary inflammation and asthma: evidence for the involvement of organic chemicals and oxidative stress. *Current Opinion in Pulmonary Medicine.* 7(1).
- Oberdörster, G., J.N. Finkelstein, C. Johnston, R. Gelein, C. Cox, R. Baggs, et A.C. Elder. 2000. Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. *Res Rep Health Eff Inst.* (96): 5-74; disc. 75-86.
- Oomen, A.G., A. Hack, M. Minekus, E. Zeijdner, C. Cornelis, G. Schoeters, W. Verstraete, T. Van de Wiele, J. Wragg, C.J.M. Rompelberg, A.J.A.M. Sips, et J.H. Van Wijnen. 2002. Comparison of Five In Vitro Digestion Models To Study the Bioaccessibility of Soil Contaminants. *Environ. Sci. Technol.* (3326-3334).
- Paustenbach D. J.[1]. 2000. THE PRACTICE OF EXPOSURE ASSESSMENT: A STATE-OF-THE-ART REVIEW. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews.* 3: 179-291.
- Polichetti, G., S. Cocco, A. Spinali, V. Trimarco, et A. Nunziata. 2009. Effects of particulate matter (PM10, PM2.5 and PM1) on the cardiovascular system. *Toxicology*. 261(1-2): 1-8.
- Ramgolam, K., S. Chevallier, F. Marano, A. Baeza-Squiban, et L. Martinon. 2008. Proinflammatory effect of fine and ultrafine particulate matter using size-resolved urban aerosols from Paris. *Chemosphere.* 72(9): 1340-1346.
- Ridgway, P. 2009. The promotion of alternatives under REACH: A political and regulatory perspective. *Reproductive Toxicology.* 28(2): 141.
- Roth, J.A. 2006. Homeostatic and toxic mechanisms regulating manganese uptake, retention, and elimination. *Biol. Res.* 39(1): 45-57.
- Sauvain, J., M. Sanchez-Sandoval Hohl, et M. Riediker. 2009. Differentiated Chemical Reactivity of Nanoparticles toward DTT. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 179(1_MeetingAbstracts): A5258.
- Sauvain, J., S. Deslarzes, et M. Riediker. 2008. Nanoparticle reactivity toward dithiothreitol. *Nanotoxicology.* 2(3): 121.
- Shukla, A., C. Timblin, K. BeruBe, T. Gordon, W. McKinney, K. Driscoll, P. Vacek, et B.T. Mossman. 2000. Inhaled Particulate Matter Causes Expression of Nuclear Factor (NF)-kappa B-Related Genes and Oxidant-Dependent NF-kappa B Activation In Vitro. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 23(2): 182-187.
- Takano, H., T. Ichinose, Y. Miyabara, T. Shibuya, H. Lim, T. Yoshikawa, et M. Sagai. 1998. Inhalation of Diesel Exhaust Enhances Allergen-Related Eosinophil Recruitment and Airway Hyperresponsiveness in Mice. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 150(2): 328-337.

Utell, M.J., M.W. Frampton, W. Zareba, R.B. Devlin, et W.E. Cascio. 2002. Cardiovascular effects associated with air pollution: potential mechanisms and methods of testing. Inhalation Toxicology: International Forum for Respiratory Research. 14(12): 1231.

Uzu, G., S. Sobanska, Y. Aliouane, P. Pradere, et C. Dumat. 2009. Study of lead phytoavailability for atmospheric industrial micronic and sub-micronic particles in relation with lead speciation. Environmental Pollution. 157(4): 1178-1185.

Yatera, K., J. Hsieh, J.C. Hogg, E. Tranfield, H. Suzuki, C. Shih, A.R. Behzad, R. Vincent, et S.F. van Eeden. 2008. Particulate matter air pollution exposure promotes recruitment of monocytes into atherosclerotic plaques. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 294(2): H944-953.

Chapitre 6

Discussion et conclusions

Depuis la révolution industrielle en Europe (XIX^e siècle), les activités anthropiques ont provoqué des changements environnementaux considérables. La composition de notre atmosphère en particulier a été fortement modifiée par l'émission de polluants gazeux et particulaires. De nombreuses études épidémiologiques, combinées à des études toxicologiques expérimentales, ont montré les effets néfastes de la pollution atmosphérique sur la santé humaine (Zanobetti et Schwartz, 2005; Ballester et al., 2006 ;Polichetti et al., 2009 ;Mills et al., 2009). De plus, les divers compartiments de l'environnement étant en interaction, les émissions atmosphériques ont très souvent un impact également, sur la qualité des sols, des eaux et des végétaux (Xiong, 1998).

L'industrie métallurgique de seconde fusion, contribue de façon significative aux émissions atmosphériques de métaux (Donisa et al., 2000). C'est pourquoi, ce travail de thèse, s'est intéressé aux différentes sources de particules émises par le procédé de recyclage du plomb, et à leurs transferts et impacts sur les sols, les végétaux et l'homme, en relation avec leurs propriétés physico-chimiques.

Plusieurs questions scientifiques étaient à l'origine de cette étude :

En premier lieu, il s'agissait de déterminer si la taille des particules qui retombent sur le sol, influence le transfert dans le système sol-plante.

En seconde partie, nous avons mis en évidence le phénomène d'absorption foliaire directe, après dépôt de particules sur les parties aériennes, et avons proposé des mécanismes potentiels.

Enfin, une étude exploratoire de l'impact toxicologique des différentes sources de particules (canalisées et diffuses) de l'entreprise a été réalisée, vis-à-vis des deux voies d'expositions prépondérantes pour l'homme : l'inhalation et l'ingestion.

Une démarche expérimentale graduelle, a permis de répondre à nos interrogations scientifiques, et de mettre en place une approche globale, pratique et transversale des impacts environnementaux du plomb, émis par une entreprise de recyclage de batteries.

Après échantillonnage des principales sources de particules, leurs propriétés physico-chimiques ont été étudiées en fonction de leur classe granulométrique. Ensuite, le transfert sol-plante a été mené sur deux sols contaminés, avec des particules issues des émissions canalisées, susceptibles d'être émises dans

l'environnement. Puis le transfert par voie atmosphérique a été évalué sur le terrain, dans l'enceinte de l'entreprise au maximum des émissions diffuses, afin de mettre en évidence le phénomène.

Enfin, l'étude exploratoire toxicologique a été conduite sur l'ensemble des particules (ambiances des ateliers et émissions canalisées) afin de prendre en compte l'exposition des salariés de l'entreprise et également celle des riverains.

Les principaux résultats obtenus sont présentés ci-dessous :

Caractérisation des particules

Les particules des différentes sources étaient très chargées en métaux (jusqu'à 50% de la composition totale en métaux de transition, alcalins et alcalino-terreux), dont certains sont potentiellement toxiques. Les concentrations des éléments majoritaires Pb, O et S, ne sont pas significativement différentes entre les différentes tailles de particules (PM_{10} / PM_{10} / $PM_{2.5}$). Ainsi, les pourcentages des principaux éléments trouvés dans les deux fractions PM_{10} et $PM_{2.5}$, montrent la dominance du plomb avec 27%, suivi par l'oxygène et le soufre, respectivement 15% et 7,5%. Les éléments secondaires : Cd (2.5%), Zn (0.5%), et Sb (0.1%) ne sont pas non plus, significativement différents en fonction de la taille des PM. Les éléments secondaires détectés à l'affinage, sont plus nombreux qu'à la sortie des fours, ce qui est cohérent avec la réalité du process de l'affinage, lieu d'élaboration d'alliages.

La spéciation semi-quantitative a été déterminée en combinant des analyses de diffraction aux rayons X, pour les spéciations majoritaires cristallisées, et de microspectrométrie Raman, pour les espèces mineures.

L'analyse des spectres obtenus par μ Raman a conduit à l'identification principale de galène (PbS), de sulfate de plomb ($PbSO_4$) ou de ses dérivés ($xPbO.PbSO_4$ $x=1,2,3$). Ces derniers composés, sont issus de la dégradation de la galène par photo-oxydation. Par ailleurs, du sulfate de sodium (Na_2SO_4) a été détecté dans toutes les fractions ; c'est un liant utilisé lors de la fusion-réduction, qui sert à abaisser le point de fusion du plomb. Enfin, cette technique a permis d'identifier des composés minoritaires, comme des carbonates de plomb, des oxydes de fer et de zinc.

Les résultats de DRX + μ Raman conduisent à des résultats similaires, du point de vue des spéciations majoritaires du Pb. Toutefois, des différences entre les deux fractions $PM_{10/2.5}$ pourraient exister : pour les composés mineurs du plomb tels que les carbonates, les sulfates de cadmium et de zinc qui n'ont pas été détectés en XRD (phase minoritaire < 1%).

⇒ Un travail technique minutieux, a donc permis de déterminer les différentes formes chimiques du plomb. Cette étude pourrait être étendue à d'autres entreprises de recyclage de batteries. Les données obtenues, permettent également de se référer aux données thermodynamiques de solubilité, précipitation, etc., afin de discuter *a priori* de la réactivité. Mais on ne connaît pas encore, les interactions entre les divers métaux, et il est actuellement impossible de réaliser ce type d'études en routine. Aussi des tests simples, comme les extractions chimiques avec des sels neutres, peuvent être également pertinentes à un premier stade d'étude.

Transfert du plomb dans le système sol-plante.

Nos résultats ont montré, qu'il existe une relation entre la taille des particules, et le transfert sol-plante. En effet, les racines exposées aux sols contenant les $PM_{2.5}$ présentent un transfert augmenté de 20% vers les parties aériennes des salades, en comparaison avec les PM_{10} . En accord avec les travaux généraux de (Ruby et al. 1999) sur la biodisponibilité, la diminution de la taille des particules issues du processus industriel, favoriserait donc le passage du plomb entre la phase solide et la solution du sol. L'activité rhizosphérique favoriserait la solubilisation du plomb, et son transfert.

Ainsi, il a été mis en évidence une augmentation de la phytodisponibilité du plomb estimée par extraction au $CaCl_2$ 0.01M, après culture accompagnée d'une baisse d'une unité de pH du sol, et ce durant une semaine de contact sol-plante.

Le plomb total ($[Pb]_{\text{adsorbé}} + [Pb]_{\text{Racines}}$) était principalement adsorbé par les racines, et de manière plus importante dans des sols contenant les $PM_{2.5}$.

La phytodisponibilité estimée par extraction au $CaCl_2$ 0.01M, sur deux sols aux caractéristiques contrastées, (teneurs en carbonates et matières organiques en particulier) augmente après le contact sol-plante, et était supérieure pour les sols dopés avec les $PM_{2.5}$.

Les exsudats acides produits par les racines, peuvent modifier la spéciation et le comportement des métaux dans la biosphère (Lin et al., 2004; Welch, 1995). Afin d'estimer le transfert du plomb vers la plante, des régressions linaires ont été réalisées sur l'ensemble des échantillons. En accord avec (Pueyo et al., 2004), dans le contexte de notre étude, l'extraction CaCl_2 s'est révélée être donc un bon indicateur du transfert du plomb contenu dans les particules vers la salade, légume feuille qualifié d'exigeant pour les éléments P et K.

⇒ Finalement, dans cette étude, c'est l'effet taille qui a été mis en évidence pour son effet sur la réactivité, et non l'effet spéciation : la spéciation chimique du plomb était en effet, relativement proche pour toutes les tailles de particules. Ces résultats amènent à réfléchir sur les filtres industriels toujours plus performants, qui ont des seuils de coupure de plus en plus bas. Les quantités rejetées sont donc moins importantes que par le passé, mais les particules émises sont les plus fines et donc, potentiellement, les plus réactives vis-à-vis de l'environnement.

Absorption foliaire par voie atmosphérique.

L'hypothèse de l'absorption foliaire des métaux a été testée dans l'enceinte de l'usine, où *Lactuca Sativa* a été exposée jusqu'à 45 jours, au maximum des émissions diffuses.

Le couplage de techniques spectrométriques et chimiques a permis de montrer, que du plomb était bien internalisé par voie atmosphérique. Après lavage, des particules étaient présentes en particulier au niveau des nervures des feuilles, et des stomates étaient obstrués. Parmi les symptômes de phytotoxicité les plus sévères, des nécroses contenant des précipités de sulfate de plomb et d'oxyde de manganèse ont été observés sur les feuilles.

Ces techniques nous ont permis de proposer des mécanismes potentiels pour l'absorption foliaire, basés sur deux voies d'entrées des particules après dépôt.

La première voie, particulaire, propose l'entrée directe des particules via les stomates comme l'a montré (Eichert et al., 2008) pour des particules < 100 nm, et un transfert direct vers l'apoplasme. La seconde voie, déjà décrite par (Schönherr, 2000) pour des fertilisants foliaires, est une entrée sous forme ionique par les pores aqueux de la cuticule et des stomates, pour du plomb libre, issu de la dissolution partielle des particules sur la feuille. Une fois transféré dans l'apoplasme, lorsque la concentration

augmente, la plante devient incapable de gérer le stress métallique ce qui conduit à la mort locale des cellules par nécrose.

⇒ Ce travail nous a finalement permis de formuler des préconisations pour l'évaluation et la gestion des risques sanitaires.

- La contamination foliaire par les métaux devrait être prise en compte autour des structures émettrices (usine de recyclage desx, fonderies, incinérateurs).
- La base de la nervure centrale des feuilles de salade, où se concentrent les principales nécroses riches en plomb, pourrait être éliminée avant consommation, afin de diminuer significativement les doses ingérées par les personnes, dont les jardins potagers sont proches d'installations industrielles.

Etude exploratoire toxicologique

L'étude préliminaire, de l'impact des émissions sur les cellules épithéliales pulmonaires humaines, a montré des différences de réactivité entre les sources de particules émises par le process de recyclage. Les cellules épithéliales ont été exposées à des doses croissantes allant de 0 à 100 μg de particules par cm^2 de cellules. Aucune cytotoxicité pour les concentrations testées, n'a été relevée pour les particules échantillonnées dans les ambiances de l'atelier d'affinage. Les particules prélevées dans les ambiances de l'atelier des fours présentent une cytotoxicité à partir de $50\mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour les $\text{PM}_{2.5}$ et dès $5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour les PM_1 . Enfin, les émissions canalisées entraînent une cytotoxicité $100\mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour les $\text{PM}_{\text{tot}/10/2.5/1}$. Toutes les sources de particules produisent une réponse inflammatoire après 24h d'exposition, avec un effet dose significatif. L'effet taille n'a pas été clairement mis en évidence pour toutes les sources de particules. Cet effet a pu cependant être masqué, par le caractère multi métallique des particules. Certains métaux sont à ce titre connus, pour avoir des effets différents vis-à-vis du stress oxydatif (Sauvain et al., 2008).

Le mécanisme communément admis de l'action des particules organiques sur les poumons, est qu'elles induisent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui mobilisent et réduisent ensuite la quantité d'antioxydants. Dans le cas des particules métalliques testées, nous proposons un mécanisme d'inhibition directe de l'antioxydant, plutôt que le mécanisme d'induction de la production de ROS ; ces deux mécanismes, conduisent toutefois à la même issue : déséquilibre entre les antioxydants et les ROS ce qui induit une inflammation des voies respiratoires. Des

essais sont en cours, afin de confirmer la complexation entre l'antioxydant (dithiothréitol) et les particules métalliques.

Concernant le risque lié à l'ingestion des particules, les expériences de bioaccessibilité ont montré, les plus fortes bioaccessibilités gastriques sont mesurées pour les plus fines fractions testées (PM_{2.5}).

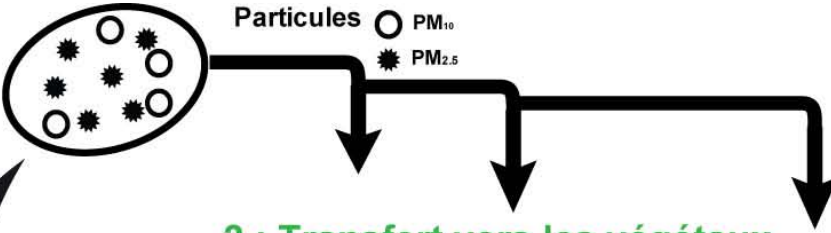
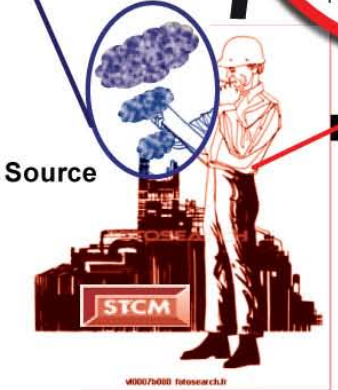
1 : Caractérisation des émissions

3 sources principales
Pas de différence de spéciation selon la taille.

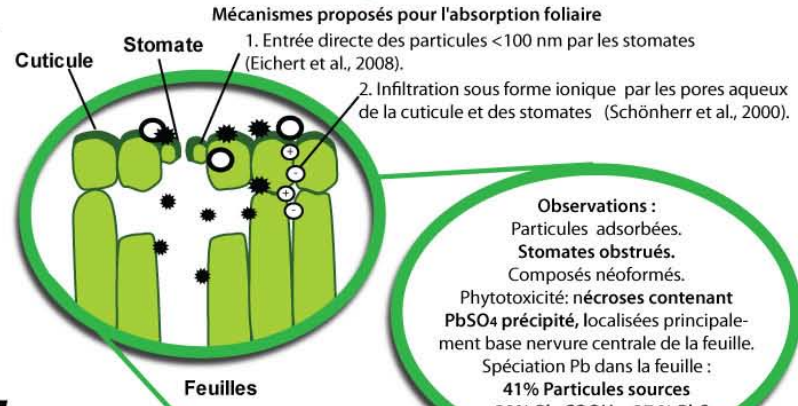
Emissions canalisées:
25-33% Pb, 75% < 10 µm
particules de formes sphériques,
44% PbO-PbSO₄ + 30% αPbO + 16%
Pb-FeOOH + 14% βPbO

Ambiances des ateliers
fours 25-45% Pb 24% < 10µm
affinage 32-41%Pb ,17% < 10 µm
particules de formes irrégulières,
PbS, PbSO₄, PbO.PbSO₄,
PbO, Na₂SO₄

Inhalation
Cytotoxicité
(0-100 µgParticules/cm² cellules):
Ambiances affinage: non.
Ambiances four: à partir 50 µg/cm² pour PM₁.
PM_{2.5} et 5 µg/cm² pour PM₁.
Emissions canalisées: à partir 100
µg/cm² pour PM_{tot}/10/2.5/1.
Inflammation dose-dépendante pour
toutes les sources.
Ingestion
Taille particules ↘, ↗ bioaccessibilité
du plomb pour toutes les sources.



2 : Transfert vers les végétaux



Observations :
Particules adsorbées.
Stomates obstrués.
Composés néoformés.
Phytotoxicité: nécroses contenant
PbSO₄ précipité, localisées principale-
ment base nervure centrale de la feuille.
Spéciation Pb dans la feuille :
41% Particules sources
+ 29% Pb-COOH + 27 % PbS.



Effet taille
Sol + PM_{2.5}: + 20% Pb transloqué par
rapport sol+ PM₁₀

↗ phytodisponibilité (CaCl₂ 0.01M) du
plomb après culture (*3 pour PM₁₀, *5
pour PM_{2.5}) + ↗ 1 unité de pH du sol
après une semaine de contact sol-plante.

3 : Transfert vers l'Homme

Figure 53 : schéma conceptuel présentant les principaux résultats de ces travaux.

Les applications qui découlent des résultats de cette thèse concernent en particulier :

- Le développement du biotest salade pour estimer la qualité des milieux.
- La prise en compte de la contamination atmosphérique dans les évaluations des risques sanitaires liés à la consommation de plantes potagères contaminées.
- La validation de tests in vitro pour estimer la biodisponibilité, la bioaccessibilité, et la toxicité des particules métalliques.

Ce type d'études, réalisées en partenariat avec les entreprises classées pour l'environnement (ICPE), les soutient dans leur politique de gestion intégrée de l'environnement.

Quelques perspectives de ce travail:

Un des points forts de cette étude, est d'avoir mené les expériences avec des particules de process, permettant ainsi de se placer en conditions réelles. Cependant, le caractère multi-métallique n'a pas permis de déterminer les rôles de chaque spéciation. Ainsi, à l'issue de ce travail, il serait intéressant de réaliser des cultures avec des particules de spéciations uniques, choisies parmi les espèces majoritaires identifiées dans le process (PbS, PbSO₄, PbO.PbSO₄...) et de différentes tailles (nanoparticules, PM_{2.5}, PM₁₀). Cela permettrait de comprendre la contribution, en fonction de la taille de chaque spéciation. De façon analogue, ces particules mono-spéciation, pourraient être testées tout d'abord seules, puis en association vis-à-vis du stress oxydatif, afin de prédire leurs effets sur le système respiratoire.

Les expériences de transfert atmosphère-plante, ont montré que le phénomène d'absorption foliaire existait, et il faudrait dès lors, étudier les mécanismes physiologiques mis en œuvre. Par exemple, (Chen et al., 2006) a observé la migration de phytochélatines des feuilles vers les racines pour *Arabidopsis*, exposée à du cadmium. Dans le cas d'absorption directe de plomb par les feuilles, ce dernier pourrait migrer vers les racines pour détoxifier les feuilles, plus sensibles que les racines.

Enfin, dans le cas d'une contamination combinée de l'air et du sol par le plomb, il serait intéressant de déterminer la part de chacun, dans le phénomène des transferts. Des études pourraient être menées, pour obtenir la concentration dans l'air, à partir de laquelle la voie de transfert atmosphérique devient prépondérante.

Références bibliographiques

- Ballester, F., P. Rodriguez, C. Iniguez, M. Saez, A. Daponte, I. Galan, M. Taracido, F. Arribas, J. Bellido, F.B. Cirarda, A. Canada, J.J. Guillen, F. Guillen-Grima, E. Lopez, S. Perez-Hoyos, A. Lertxundi, S. Toro, et for the EMECAS group. 2006. Air pollution and cardiovascular admissions association in Spain: results within the EMECAS project. *J Epidemiol Community Health*. 60(4): 328-336.
- Chen, A., E.A. Komives, et J.I. Schroeder. 2006. An Improved Grafting Technique for Mature Arabidopsis Plants Demonstrates Long-Distance Shoot-to-Root Transport of Phytochelatins in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 141(1): 108-120.
- Donisa, C., R. Mocanu, E. Steinnes, et A. Vasu. 2000. Heavy Metal Pollution by Atmospheric Transport in Natural Soils from the Northern Part of Eastern Carpathians. *Water, Air, & Soil Pollution*. 120(3): 347-358.
- Eichert, T., A. Kurtz, U. Steiner, et H.E. Goldbach. 2008. Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles. *Physiologia Plantarum*. 134(1): 151-160.
- Lin, Q., Y.X. Chen, Y.F. He, et G.M. Tian. 2004. Root-induced changes of lead availability in the rhizosphere of *Oryza sativa* L. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 104(3): 605-613.
- Mills, N.L., K. Donaldson, P.W. Hadoke, N.A. Boon, W. MacNee, F.R. Cassee, T. Sandström, A. Blomberg, et D.E. Newby. 2009. Adverse cardiovascular effects of air pollution. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 6(1): 36-44.
- Polichetti, G., S. Cocco, A. Spinali, V. Trimarco, et A. Nunziata. 2009. Effects of particulate matter (PM10, PM2.5 and PM1) on the cardiovascular system. *Toxicology*. 261(1-2): 1-8.
- Pueyo, M., J.F. Lopez-Sanchez, et G. Rauret. 2004. Assessment of CaCl₂, NaNO₃ and NH₄NO₃ extraction procedures for the study of Cd, Cu, Pb and Zn extractability in contaminated soils. *Analytica Chimica Acta*. 504(2): 217-226.
- Sauvain, J., S. Deslarzes, et M. Riediker. 2008. Nanoparticle reactivity toward dithiothreitol. *Nanotoxicology*. 2(3): 121 - 129.
- Schönherr, J. 2000. Calcium chloride penetrates plant cuticles via aqueous pores. *Planta*. 212(1): 112-118.
- Welch, R. 1995. Micronutrient nutrition of plants. *Critical Reviews in Plants Sciences*.
- Xiong, Z. 1998. Heavy metal contamination of urban soils and plants in relation to traffic in Wuhan city, China. *Toxicological & Environmental Chemistry*. 65(1): 31.
- Zanobetti, A., et J. Schwartz. 2005. The Effect of Particulate Air Pollution on Emergency Admissions for Myocardial Infarction: A Multicity Case-Crossover Analysis. *Environmental Health Perspectives*. 113(8): 978-982.

Table des illustrations

Figure 1 : (1), (2a), (2b) et (3) : questions scientifiques abordées par cette thèse. La cible 1 correspond aux végétaux et la cible 2 aux salariés de l'entreprise.	14
Figure 2 : Facteurs régissant la biodisponibilité du plomb : taille, spéciation et effets d'association et de matrice.....	18
Figure 3 : Appareil respiratoire et niveau de pénétration des particules en fonction de leur diamètre aérodynamique. Source : http://www.capenvironnement.fr/img_tpp/squel4-pr-poussieres.jpg	23
Figure 4 : Environnement de la STCM : entreprises et habitations. source : www.googlemaps.com pour le fond de carte.....	36
Figure 5 : Schéma des opérations suivies dans l'usine (source : STCM-APSM)	37
Figure 6 : Four rotatif.....	39
Figure 7 : rose des vents Station Blagnac, année 2007, DV : direction des vents, VV : vitesse du vent : bleu clair (1-2 m/s) à bleu foncé (5-6 m/s) (source Oramip).....	41
Figure 8 : Courbes d'iso-concentration en plomb 0-25 cm (violet : 150 mg/kg, bleu : 100 mg/kg) autour de l'usine et concentrations ponctuelles mesurées en 2001 et 2004. source : www.googlemaps.com pour le fond de carte.....	42
Figure 9 : manche filtrante du four. (source STCM-ASPM).....	45
Figure 10 : Schéma localisant les trois sources de particules échantillonnées	47
Figure 11 : photos de la campagne d'échantillonnage.	47
Figure 12: Principe de l'impacteur inertiel en cascade.....	49
Figure 13 : impacteur inertiel Dekati PM10/2.5/1.....	50
Figure 14 : mise en œuvre de la remise en suspension de particules.....	50
Figure 15 : stratégie de caractérisation des particules du procédé STCM.....	52
Figure 16 : Protocole d'extraction CaCl ₂	56
Figure 17 : Spectre Raman et schéma de principe de la microspectrométrie Raman confocale	61
Figure 18 : a) image optique divisée en (2×2) pixels ; b) spectres des pixels correspondants à la zone analysée contenant (2×2) spectres Raman.	63
Figure 19 : Description du dispositif de micro-culture.....	68
Figure 20 : Expériences Micro-culture.....	69
Figure 21: Résumé de la récolte micro-culture et protocoles d'analyse.....	71
Figure 22 : Mécanisme d'oxydation du DTT en présence d'une liaison disulfide (état oxydé).....	77
Figure 23 : SEM observations on PM of different sources.	101
Figure 24 : CaCl ₂ (0.01M) extraction. Results expressed as the percentage of the total particle Pb content.	103
Figure 25 : Microculture device	118
Figure 26: ESEM images of PM2.5 (A) and PM10 (B).....	123

Figure 27 : Raman image of PM2.5 particles after a smoothing procedure. Blue 4PbO.PbSO4, pink PbO.PbSO4, red Na2SO4 and green substrate.	124
Figure 28 : Total contents (A) and relative contents (B) of lead extracted with CaCl2 on particles (white), spiked soils with lead particles of different size before (grey) and after (black) a seven-days exposure of <i>Lactuca sativa</i> , n=5.	125
Figure 29 : Plant biomass data for aerial parts (black) and roots (grey). The error bars indicate the standard deviation while different letters show significant differences ($p < 0.05$) as measured by an LSD fisher test (one-factor ANOVA).	126
Figure 30 : Lead concentrations in different plant compartments: A: adsorbed onto roots, B: root uptake and C: translocated in shoots.	128
Figure 31 (a) Optical image of the basal part of the lettuce leaf exposed to atmospheric fallouts. Brownish spots correspond to Pb-associated necroses. (b) XRF spectra of Pb-rich necroses shown in (c). (c-f) Tri color and two color μ XRF elemental maps for Ca, Pb and S (c), Fe, Pb and Mn (d), K and S (e), and Ca and K (f)..	147
Figure 32 . ESEM-EDX analyses of Pb-rich regions on lettuce leaves exposed to atmospheric fallouts. (a) Two large necroses shown in BSE mode. The EDX semi-quantification for spots 1 and 2 gave 9% Pb, 1% Cl, 1% Mn, 1% Fe, 20% O, 2% Mg and 65% P. (b) SE and BSE images of a necrosis, elemental distribution of Pb, Ca and Mn, and multi-color map showing the distribution of Ca, Mn, Zn, Fe and Mn. (c) SE image of a necrosis. Particles are visible on the leaf surface, as well as beneath the surface. (d) Stomata plugged by Pb-containing particles (e) Secondary Pb-containing compounds formed on the leaf surface.	150
Figure 33 : Tentative pathways for lead uptake after deposition of Pb-containing particles. Deposition of particles on the leaf surface (1), chemical transformation on the leaf surface leading to secondary Pb-containing phases and possibly solutes (2). Accumulation of particles in stomata and possibly penetration of nanoparticles (3a). Possible diffusion of solutes via aqueous pores present on cuticular ledges of stomata (3b1) and anticlinal cell walls of cuticles (3b2). Toxicity symptoms (necroses) induced by the presence of the contaminated particles on the leaf (4).	153
Figure S34 : (a) optical image of a part of the lettuce leaf exposed to atmospheric fallout. Dark zones correspond to necroses. (b-e) Tri color and two color μ XRF elemental maps for Ca, Pb and S (b), Fe, Pb and Mn (c), K and S (d), and Ca and K (e).	159
Figure S35 : μ XRF elemental maps for a Pb-rich necrosis. Ca and Mn are present in the necrosis but do not quite match Pb localization. The necrosis also contains Zn, P and Si.	160
Figure S36: Secondary (top) and back scattered (bottom) electron images of necroses. Particles containing heavy elements present in the necrotic zone are covered by an organic membrane.	161
Figure S37: Organic membrane covering a necrotic zone of the leaf.	162
Figure S38: μ Raman spectra of lead-rich and carbonate zones of a necrosis.	162
Figure S39: SEM-EDX images of particles present on the leaf surface.	163
Figure S40 : μ Raman (wavelength in the visible region) punctual spectra of the trapped particles.	164

Figure S41: SEM images of stomata plugged by particles of various sizes.....	165
Figure S42 : SEM images of Pb-containing secondary compounds observed on the leaf surface.....	166
Figure 43: routes of intake of lead-rich particles and impacted organs.....	Erreur ! Signet non défini.
Figure 44: Average size distribution of particles from the three different origins (n=10 for each origin). ...	179
Figure 45 : DTT consumption in pmol DTT.min ⁻¹ .µg ⁻¹ for the different particles suspensions in Tween 80® 0.6 mg/L	181
Figure 46: Cytotoxic potential of Emissions, Refining and Furnace PM.	182
Figure 47: Pro-inflammatory potential of PM on 16HBE cells. GM-CSF, production was evaluated after treating 16HBE14o- cells with PM for 24 h at 5, 25, 50, or 100 µg cm ⁻² . Secreted cytokines were assessed by ELISA. Data are represented as mean of 3 wells ± SD. * statistically different from control p < 0.05, + statistically different among the treated groups, p<0.05	183
Figure 48: lead gastrical bioaccessibility values for particles samples (PM _{tot/2.5}). (results expressed as the percentage of the total lead content).....	Erreur ! Signet non défini.
Figure 49: Secretion of GM-CSF at 5 µg/cm ² in function of PM size.	185
Figure 50: DTT reactivity at 5 µg/cm ² in function of PM size.	186
Figure 51: correlation for PM ₁ of all sources (Refining, Furnace, Emissions) between pro-inflammatory signal (GM-CSF) and ROS-signal (DTT assay) for 3 sites, each with 3 samples per site; r ₂ =1-0.95 for 5-25 µg/cm ² , not significant for 50 and 100 µg/cm ²	187
Figure 52 : schéma conceptuel présentant les principaux résultats de ces travaux.....	201

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : comparaison de protocoles d'extractions aux sels neutres</i>	55
<i>Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques des sols S1 et S2.</i>	70
<i>Tableau 3 : Composition des solutions digestives pour le test in vitro UBM</i>	83
<i>Table 1 : Granulometry of PM emitted by the lead recycling process</i>	95
<i>Table 2 : Elemental total contents.(results are expressed as the mean of three replicates). *,** significant differences ($p<0.05$) as measured by an LSD fisher test (one-factor ANOVA).</i>	98
<i>Table 3 : Determination of main chemical speciations of lead in the samples by X-Ray Powder Diffraction Analysis.</i>	99
<i>Table 4 : Determination of major (bold) and minor chemical speciations of lead in the samples by Raman microspectromety</i>	102
<i>Table 5 :Physico-chemical characteristics of the two soils used for micro-culture experiments</i>	119
<i>Table 6 : Total elemental analysis of particles</i>	122
<i>Table 7 : Determination of main chemical speciation of lead in the PM10 and PM2.5 particles by X-Ray Powder Diffraction Analysis a</i>	122
<i>Table 8 : Tranfer factors in roots (TFr) and shoots (TFs) and translocation ratios.</i>	129
<i>Table 9 : lead concentration in process particles according to their size. * Significant differences among fractions $PM_{tot/10/2.5}$. ($p<0.01$, $n=3$)</i>	180