

Relation entre la composition de particules industrielles et leur transfert dans les feuilles de plantes potagères

Relationship between the composition of industrial particles and their transfer in leaves of vegetables

V. Dappe¹, D. Cuny², B. Hanoune³, S. Dumez², A. Austruy⁴, C. Dumat⁵, S. Sobanska¹

Résumé

La part des particules fines et très fines (PM_{2.5} et PM₁) émises dans l'atmosphère a augmenté de manière significative dans les zones industrielles, en lien avec la mise en place, en sortie d'échappement des usines, de filtres de plus en plus efficaces vis-à-vis des fractions granulométriques plus grossières. Ces particules fines et très fines sont très réactives et présentent donc un risque élevé à la fois pour la santé humaine et les milieux environnants (air, sol, eau, végétal). Ces particules microniques et submicroniques sont en effet capables de pénétrer profondément dans l'appareil respiratoire et d'atteindre les alvéoles pulmonaires. L'ingestion est également une voie d'exposition importante, notamment par la consommation de végétaux contaminés en zones urbaines (où la densité de population est particulièrement élevée) et/ou aux abords des zones industrielles. L'étude de l'accumulation et du transfert de particules par voie foliaire chez des végétaux cultivés en proximité d'usines émettant des particules riches en métaux est donc d'un intérêt majeur. Nos travaux concernent l'étude de l'accumulation foliaire de particules émises par une usine de recyclage de batteries au plomb et de leur transfert dans les tissus des feuilles. Dans un premier temps, nous avons caractérisé des particules à l'échelle individuelle grâce au couplage de techniques spectroscopiques et d'imageries. Les résultats montrent que le plomb se retrouve majoritairement dans les fractions les plus fines (PM₁), essentiellement sous forme de sulfates. Nous avons mis en évidence la formation de composés de plomb solubles, en surface des particules. Dans un second temps, des choux ont été exposés aux particules dans l'enceinte de l'usine pour une durée de 6 semaines. Les résultats montrent une accumulation assez importante de particules contenant du plomb dans les feuilles, s'accompagnant parfois de la formation de nécroses enrichies en métaux. Dans certaines de ces nécroses, la spéciation du plomb se trouve modifiée. Afin de mieux comprendre ces phénomènes bio-physico-chimiques identifiés sur le terrain, des tests d'exposition à différents types de particules monométalliques ont été effectués en conditions contrôlées au laboratoire. Les résultats, complétés par des tests biologiques, montrent des différences significatives d'un métal à un autre, notamment en termes de génotoxicité liée aux métaux..

Mots-clés

accumulation, particules très fines (PM₁), plomb, spéciation, transfert, voie foliaire.

(1) Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman (LASIR, UMR 8516 CNRS), université de Lille 1, Bât. C5, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France – vincent.dappe@ed.univ-lille1.fr

(2) Laboratoire des Sciences Végétales et Fongiques (LSVF), université Lille Nord de France, faculté des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques, 3 rue du Professeur Laguesse, B.P. 83, Lille cedex

(3) Physico-chimie des Processus de Combustion et de l'Atmosphère (PC2A, UMR 8522 CNRS), université de Lille 1, Bât. C11, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France.

(4) Ecolab, université de Toulouse, INP-ENSAT, avenue de l'Agrobiopole, 31326 Castanet-Tolosan, France.

(5) Certop, université Toulouse-Le Mirail, UTM-CERTOP, CNRS UMR 5044, France.

Abstract

The proportion of fine and very fine particles (PM_{2.5} and PM₁) emitted into the atmosphere has significantly increased in industrial areas, since more efficient filters towards coarse particles size fraction are set up in chimney exit facilities. These fine and very fine particles are very reactive and may represent a significant risk for human health and may contaminate the surrounding environments (air, soil, water, vegetable). The micronic and submicronic particles can deeply penetrate into the respiratory system and reach alveoli. Ingestion also represents a significant route of particles exposure through the consumption of contaminated vegetables. Studying the accumulation and transfer of particles through foliar way in vegetables cultivated near factories emitting metal-rich particles is therefore of major interest. This work concerns the study of foliar accumulation of particles emitted by a lead battery recycling facility and their transfer into the leaf tissues. First, particles were characterized at the particle scale through the coupling of imaging and spectroscopic techniques. Results show that lead is predominantly found in finer size fraction (PM₁), mainly as sulfate compounds. We have demonstrated the formation of soluble lead compounds on the particles surface. Secondly, cabbage plants were exposed to particles in the facility courtyard for a 6 weeks period. Results show an important accumulation of lead containing particles in the leaves with sometimes the formation of necrotic areas enriched with metals. In some of these necrosis, Pb speciation changed. Finally, to better understand the bio-physicochemical phenomenon of foliar transfer, exposure of leaves cabbages to different types of monometallic particles were carried out in controlled conditions at the laboratory. The results were subjected to biological tests and have shown significant differences in term of genotoxicity regarding the metal specie considered.

Keywords

accumulation, foliar pathway, metals, speciation, transfer, very fine particles (PM₁).

1. Introduction

Dans les pays industrialisés, les émissions atmosphériques de particules issues des activités industrielles ont largement diminué notamment du fait de l'évolution de la réglementation et de la fermeture de certains sites. Cependant, des quantités non négligeables de particules atmosphériques grossières, fines et très fines (PM₁₀, PM_{2.5} et PM₁) riches en métaux (As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn...) sont observées en zones industrielles et urbaines avec des concentrations pour certains métaux dépassant, parfois, les seuils fixés par les réglementations française et européenne (Bu-Olayan et Thomas, 2009 ; Harrison et Yin, 2010 ; Moreno *et al.*, 2010 ; Zhang *et al.*, 2005). Pour certains pays (Chine, Inde, Pakistan...) qui produisent et exportent dans le monde de grandes quantités d'articles, la réglementation sur la qualité de l'air se renforce progressivement, mais permet actuellement des niveaux de PM émis dans l'environnement relativement élevés (WHO, 2014). Les particules riches en métaux ou métalloïdes sont essentiellement émises par des activités anthropiques telles que le transport (Duong et Lee, 2011 ; Faiz *et al.*, 2009) et l'industrie (Batonneau *et al.*, 2006 ; Galsomiers, 2006 ; Johnson *et al.*, 2007 ; Moffet *et al.*, 2010 ; Sobanska *et al.*, 2014 ; Uzu *et al.*, 2011) et font l'objet d'un suivi dans le cadre des réglementations européennes de la surveillance de la qualité de l'air (96/62/CEE ; 99/30/CE ; 2003/0164/COD). Plusieurs études montrent que les métaux sont concentrés dans les particules de fractions granulométriques les plus fines (Harrison et Yin,

2010) voire nanométriques (Midander *et al.*, 2012 ; Pöschl, 2008 ; Taixo *et al.*, 2014). Certains métaux (Cd, Pb, Ni, As, Hg) sont classés « *Substance of Very High Concern* » (Réglementation REACH), et leur présence dans les retombées de particules fines représente un risque (éco)toxique significatif.

Les retombées de particules riches en métaux peuvent entraîner une contamination des sols (Donisa *et al.*, 2000), des eaux de surface (Sanyal *et al.*, sous presse) et des végétaux (Uzu *et al.*, 2009 ; 2010). Pour l'homme, outre le risque sanitaire induit par l'inhalation des particules, la consommation de végétaux contaminés (Douay *et al.*, 2008 ; Dumat *et al.*, 2006 ; Xiong *et al.*, 2014) et l'ingestion de sols pollués (Landrigan et Todd, 1994) sont les deux voies d'exposition retenues dans le cadre des évaluations des risques sanitaires. De nombreuses études attribuent la contamination des végétaux au transfert sol-plante (Cecchi *et al.*, 2008 ; Zheng *et al.*, 2007). Cependant, il a été récemment démontré que 25 à 40 % de la teneur totale en métaux provenaient du transfert foliaire des métaux contenus dans des particules industrielles (Nowack et Buchelli, 2007 ; Schreck *et al.*, 2012 ; Uzu *et al.*, 2011). Enfin, les processus d'accumulation et de transfert des métaux vers les plantes sont fortement dépendants des caractéristiques physico-chimiques des PM (Uzu *et al.*, 2011).

Comprendre les mécanismes en jeu dans les transferts des polluants métalliques issus des PM et leurs transformations (spéciation chimique, solubilité, etc...) dans les écosystèmes terrestres est un enjeu scienti-

fique aux applications sociétales et sanitaires faisant l'objet de recommandations du Conseil National de l'Air (Gombert *et al.*, 2005). Afin de prédire l'impact et le devenir des particules fines riches en métaux dans les écosystèmes terrestres, il est nécessaire de connaître les teneurs en métaux totaux contenus dans les PM mais également la taille et la composition chimique (spéciation) des particules. En effet, ces paramètres sont indispensables à la prédiction de leur disponibilité, de leur accessibilité et *in fine* de leur toxicité (AFSSET, 2008). La réglementation sur l'air pourrait ainsi intégrer progressivement de nouvelles mesures lorsque des méthodes normalisées seront disponibles à des coûts raisonnables et que l'espace public se mobilisera fortement pour une meilleure prise en compte des aspects environnement et santé (c'est ce qui se produit actuellement en Chine).

Dans ce contexte, le but de notre étude est de mettre en relation les caractéristiques physico-chimiques de particules émises par une industrie de recyclage de batterie au plomb et le transfert des métaux dans l'appareil foliaire des végétaux. Dans ce travail, nous avons (i) caractérisé les particules avant leur retombée sur des plantes potagères (chou commun) et (ii) nous avons estimé l'accumulation et le transfert du Pb dans les feuilles en relation avec la spéciation du plomb issu des particules de l'usine. Enfin, l'effet phytotoxique induit par l'exposition aux particules a été évalué sur des plantes exposées, en conditions contrôlées, à des particules « modèles » de composition connue.

2. Matériels et méthodes

2.1. Prélèvements des particules

Les particules ont été prélevées dans la cour d'une usine de recyclage de batteries au plomb. Le recyclage des batteries s'effectue en 3 étapes : le broyage, l'affinage et la fonte. Les particules émises dans l'atmosphère de ces trois ateliers ont été caractérisées lors d'études antérieures (Uzu *et al.*, 2009 ; 2011). Jusqu'en 2012, l'émission moyenne de plomb dans l'atmosphère par l'usine s'élevait à 31 kg.an⁻¹. 90 % des particules émises par l'usine sont de taille inférieure à 100 µm dont 50 % inférieure à 10 µm. Ces particules contiennent 33 % de Pb, principalement sous

la forme de plomb natif (Pb⁰), d'oxydes et de sulfates de plomb (Uzu *et al.*, 2011).

La campagne d'échantillonnage a été réalisée durant deux jours représentatifs de l'activité de l'usine. Les particules ont été collectées à l'aide d'un impacteur inertiel en cascade (impacteur PM₁₀, Dekati Ltd, Finlande) équipé de deux étages de collection afin de recueillir les PM₁₀ (1 µm < taille particule < 10 µm) et les PM₁ (0,1 µm < taille particule < 1 µm) sur des supports adaptés aux microanalyses. Un prélèvement le matin (échantillons am) et un prélèvement l'après-midi (échantillons pm) ont été réalisés. Le temps d'échantillonnage a été fixé à 30 min afin d'obtenir des particules dispersées sur le substrat, permettant une analyse à l'échelle de la particule individuelle (Sobanska *et al.*, 2006). Le dispositif de collecte des particules a été placé en proximité des végétaux afin de relier les caractéristiques des particules retombées et celles des particules présentes sur/dans les feuilles des végétaux. Les conditions météorologiques enregistrées pendant la période d'échantillonnage sont présentées dans le tableau I. La concentration en plomb mesurée dans l'atmosphère en proximité de l'usine pendant la période d'échantillonnage était de 0,28 µg/m³ (source : ORAMIP, 2011).

2.2. Exposition des végétaux aux particules

2.2.1. Exposition dans la cour de l'usine

Les végétaux ont été exposés dans la cour de l'usine à proximité du dispositif de collecte des particules. Le chou commun (*Brassica oleracea*) a été utilisé, d'une part, parce qu'il possède de larges feuilles permettant l'interception des particules, d'autre part, parce qu'il possède une épaisseur de cires épicuticulaires importante, permettant de retenir plus facilement les contaminants. Cette spécificité fait que le chou est choisi, par exemple, comme espèce modèle pour la biosurveillance des HAP (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques) atmosphériques par le VDI (Verein Deutscher Ingenieure) en Allemagne (norme allemande VDI 3957). Les plantes ont été cultivées en pot dans des sols non contaminés, avec une membrane géotextile placée sur le sol afin d'éviter toute contamination par voie racinaire selon le protocole décrit dans des travaux précédents (Uzu *et al.*, 2010). Afin

Tableau I. Teneurs moyennes en PM₁₀ et PM_{2,5} mesurées à proximité de l'usine (< 1km) et conditions météorologiques moyennes mesurées durant la période d'échantillonnage (ORAMIP).

Mean concentrations of PM₁₀ and PM_{2,5} measured near the facility (< 1km) and meteorological conditions measured during the sampling period (ORAMIP).

	PM ₁₀ (µg/m ³)	PM _{2,5} (µg/m ³)	Temperature (°C)	Vent (km.h ⁻¹)	Humidité relative
am	40	30	6,5-15,4	10-20	55-80 %
pm	15	10			

d'évaluer l'effet de la concentration en cires épicuticulaires sur l'accumulation et le transfert des métaux dans les feuilles, nous avons appliqué, sur la moitié de nos échantillons, un traitement chimique permettant de réduire l'épaisseur de la cuticule du chou. Le traitement consiste en l'application d'un mélange de 20 ml de solution d'acide trichloracétique (TCA, 10^{-4} g/g) à raison d'une fois par semaine dans les sols comme décrit dans la littérature (Garrec *et al.*, 1995 ; Rzepka, 2008). Après 6 semaines d'exposition, 10 plants non traités et traités sont récoltés. Avant l'analyse élémentaire, les feuilles sont lavées 2 fois à l'eau déionisée pour éliminer les particules non fixées sur la surface.

2. 2. 2. Exposition en conditions contrôlées

Afin de déterminer la phytotoxicité de différents métaux, des plants de choux ont été exposés à 3 types de particules monométalliques de taille et de spéciation connues, à savoir $PbSO_4$ (PM_{10} Lead (II) sulfate, Puratronic®, 99,999 %, Alfa Aesar, France), CdO (PM_1 Cadmium oxide, purum p.a., ≥ 99.0 % (KT), brown, Sigma-Aldrich, United Kingdom) et CuO ($PM_{0.1}$ Copper (II) oxide, 99,999 % trace metals basis, Sigma-Aldrich, United Kingdom). Les dépôts secs de particules ont été réalisés à l'aide d'un pinceau, à raison de 10 mg de particules pour 3 plants permettant d'avoir une concentration comparable aux dépôts atmosphériques mesurés pour les plants exposés dans la cour de l'usine ($\sim 30 \mu g/m^3$). Les plantes sont placées dans une chambre d'exposition permettant le suivi de l'humidité, de la luminosité et de la température. Le schéma du dispositif d'exposition est présenté

figure 1. De même que précédemment, la moitié des plants de choux a été traitée avec du TCA afin de limiter le développement des cires épicuticulaires. Des prélèvements ont été effectués après 5, 10 et 15 jours d'exposition.

2. 3. Caractérisation des retombées atmosphériques

La caractérisation des particules a été effectuée par le couplage de différentes techniques spectrométriques et d'imageries résolues spatialement.

2. 3. 1. Microscopie électronique à balayage analytique (MEB-EDX)

La microscopie électronique à balayage analytique permet d'obtenir la taille et la composition élémentaire des particules individuelles. L'estimation des tailles des particules a été obtenue grâce à un microscope électronique environnemental (MEBE-Quantax 200 FEI) équipé d'un détecteur à dispersion d'énergie des rayons X Quanta EDX (Quantax QX2, Rontec). Les mesures ont été réalisées à 20 kV en mode « low » vacuum (5 % H_2O), avec une pression de 0,98 Torr dans la chambre échantillon. Des images en électrons secondaires (SE) et en électrons rétrodiffusés (BSE) ont été enregistrées afin de déterminer les tailles et le nombre de particules.

La quantification élémentaire dans les particules individuelles a été réalisée avec un microscope électronique à balayage (JEOL JSM-6390) équipé d'une

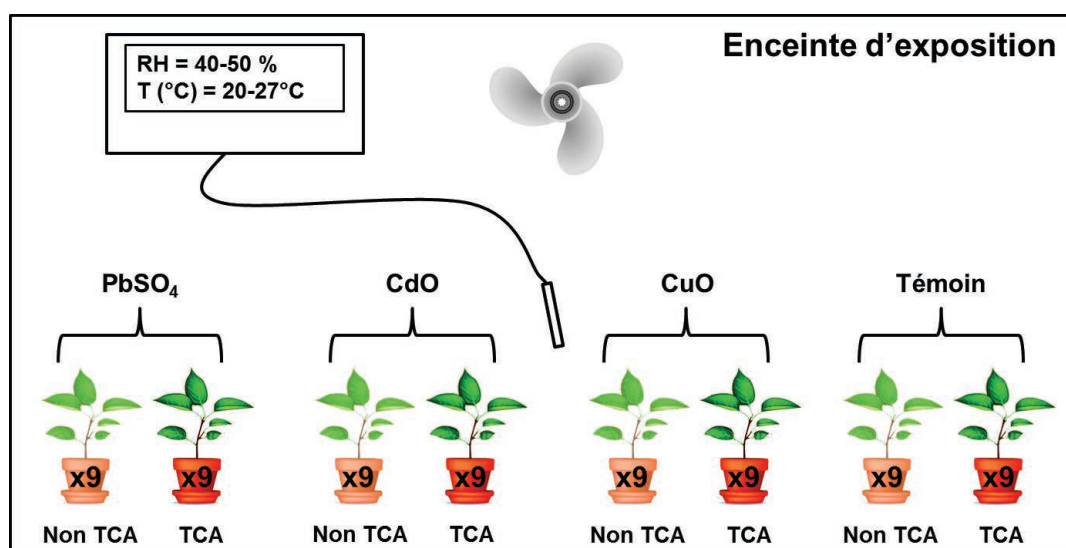


Figure 1. Schéma du dispositif expérimental d'exposition des plantes en conditions contrôlées.
Scheme of the experimental setup dedicated for the plants exposure in controlled conditions.

sonde WDX (Oxford). Une tension d'accélération de 10 kV a été utilisée afin de travailler dans des conditions optimales d'analyse (Eom *et al.*, 2013 ; Lombi *et al.*, 2011). Un courant de faisceau de 0,5 nA, et un temps typique de mesure de 15 s ont été optimisés pour nos échantillons. Les concentrations élémentaires dans les particules individuelles ont été déterminées à partir des intensités mesurées sur les spectres d'émission X suivant la procédure décrite précédemment (Eom *et al.*, 2013 ; Geng *et al.*, 2013 ; Hwang *et al.*, 2006 ; Kang *et al.*, 2009 ; Ro *et al.*, 1999 ; 2001).

2.3.2. *Microspectrométrie Raman*

La caractérisation moléculaire des particules individuelles a été réalisée par Microspectrométrie Raman confocale à l'aide d'un LabRam HR (Horiba, Jobin-Yvon) équipé d'un objectif Olympus X100 (NA 0.9). Les particules déposées sur un support adapté (lames de silice amorphe pure) sont placées sur une platine motorisée en XY sans aucune préparation préalable. Les analyses Raman ont été effectuées à température ambiante avec un laser de longueur d'onde excitatrice à 473 nm. Une caméra vidéo fournit des images optiques des particules déposées. Les analyses ont été réalisées en mode ponctuel automatisé et en mode imagerie. La première méthode consiste à enregistrer automatiquement un spectre ponctuel pour chaque particule sélectionnée sur la base de la reconnaissance des images optiques. L'analyse Raman en mode ponctuel automatisé génère un jeu de données en deux dimensions ($n \times \lambda$), soit n spectres (n particules), chacun contenant $\lambda = 2040$ éléments spectraux correspondant à une plage spectrale d'environ $1\,000\text{ cm}^{-1}$ avec une résolution spectrale de 4 cm^{-1} . Cette méthode d'analyse permet d'associer la composition moléculaire et la taille de chaque particule individuelle, ainsi que de quantifier (en nombre de particules) les espèces présentes. L'imagerie consiste à réaliser des cartographies de particules. Après sélection d'une zone contenant une particule, les spectres sont enregistrés point par point selon un balayage en XY (x et y points) avec un pas de $0,5\text{ }\mu\text{m}$. Le balayage génère un ensemble de données tridimensionnelles ($x \times y \times \lambda$), i.e. $x \times y$ pixels (spectres), chacun contenant $\lambda = 2040$ éléments spectraux. Le mode imagerie permet d'obtenir la répartition des espèces moléculaires dans une particule individuelle. Le logiciel Labspec 5.1 a été utilisé pour l'acquisition des données et leur traitement. Le traitement des données spectrales peut être amélioré de manière significative en utilisant les méthodes basées sur la résolution de courbes multivariées (MCR) (Batonneau *et al.*, 2004 ; Eom *et al.*, 2013 ; Geng *et al.*, 2013 ; Hwang *et al.*, 2006 ; Kang *et al.*, 2009 ; Lombi *et al.*, 2011 ; Ro *et al.*, 1999 ; 2001). Cette méthode détaillée dans des

travaux antérieurs (Batonneau *et al.*, 2004 ; Juan *et al.*, 2005, 2006 ; Windig *et al.*, 2002), permet d'extraire les spectres Raman purs (un spectre correspond à un seul composé) de l'ensemble des données spectrales enregistrées. Il est alors possible de relier la taille des particules à leur nature chimique et de connaître la proportion de particules pour une espèce donnée. Le traitement des données 3D permet d'obtenir la distribution spatiale de chacune de ces espèces dans la zone cartographiée. Ainsi l'imagerie Raman nous informe sur l'hétérogénéité chimique d'une particule. L'identification des espèces moléculaires s'effectue par comparaison des spectres Raman expérimentaux et des spectres Raman provenant de bases de données connues, ou obtenus sur des composés de référence.

2.3.3. *Spectrométrie de masse d'ions secondaires couplée à un analyseur à temps de vol (ToF-SIMS)*

La composition de surface des particules a été caractérisée par ToF-SIMS. Les analyses ont été effectuées avec un instrument ToF-SIMS5 (IonToF, Allemagne) utilisant une source pulsée d'ions primaires (Bi^{3+}) à 25 keV. Les échantillons ont été placés sous vide à $2,5\text{--}5,5 \times 10^{-7}$ mbar. Des zones de $500 \times 500\text{ }\mu\text{m}^2$ ont été analysées par balayage du faisceau d'ions (résolution latérale $\sim 1\text{ }\mu\text{m}^2$). Les spectres de masses ont été enregistrés en mode positif et en mode négatif. Dans nos conditions expérimentales, la profondeur de la surface analysée est inférieure à 5 nm.

2.3.4. *Traitement des images*

Le nombre et la taille des particules ont été déterminés à l'aide du traitement des images électroniques (images SE et BSE) réalisées pour chaque classe granulométrique (PM_{10} et PM_1). Une surface totale d'environ 1 mm^2 par échantillon a été imagée. Le traitement des images a été réalisé grâce au logiciel ImageJ 1.42.1 (National Institute of Health). La création d'images binaires à partir des images SE fournit la distribution granulométrique des particules en estimant leur diamètre géométrique moyen et le nombre total de particules présentes dans le champ sélectionné de l'image. Le nombre total de particules collectées a été calculé en prenant en compte le débit de la pompe utilisée lors de l'impaction des particules (10 L/min). La proportion des particules riches en plomb a été estimée à partir des images BSE qui sont contrastées en fonction du numéro atomique Z .

2. 4. Caractérisation des feuilles de plantes

2. 4. 1. Concentrations totales en métaux dans les feuilles contaminées

Après récolte, les feuilles des plantes ont été séchées à l'étuve à 40 °C pendant 72 h puis minéralisées dans l'eau régale (mélange de ¼ de HNO₃ et de ¾ de HCl) à 80 °C pendant 4 h avec un appareil Digiprep® (SCP Science). Les concentrations en métaux ont ensuite été mesurées par ICP-OES (Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectroscopy, IRIS Intrepid II XXDL). Chaque échantillon a été analysé en triple exemplaire, et des plants témoins (non contaminés) soumis au même traitement (séchage et minéralisation) ont servi de référence pour la mesure des concentrations élémentaires. Les limites de détection et de quantification des concentrations en plomb sont respectivement de 0,3 et 0,4 µg/l (Gombert *et al.*, 2005 ; Schreck *et al.*, 2012). La précision des mesures a été contrôlée en utilisant des matériaux de référence certifiés (feuilles de tabac de Virginie, CTA-VTL-2, ICHTJ et TM-26.3 provenant de l'Institut National de la Recherche de l'Eau, Canada). Les concentrations trouvées correspondaient à 98 % des valeurs certifiées.

2. 4. 2. Identification des zones riches en métaux et spéciation par microscopie électronique à balayage et microspectrométrie Raman

Les analyses de microscopie électronique et de microspectrométrie Raman ont été effectuées sur les surfaces de feuilles contaminées (faces adaxiales) par les dépôts de particules (atmosphériques ou particules modèles).

Les observations effectuées par microscopie électronique analytique (MEB-EDX) ont été menées pour localiser les métaux à la surface des feuilles. Cinq échantillons de chaque type de plants ont été observés pour contrôler et valider nos observations. Toutes les feuilles ont été séchées et fixées sur des supports en carbone sans aucune préparation préalable. Les conditions analytiques sont identiques à celles utilisées pour l'analyse des particules (voir § 2.3.1). L'analyse des images BSE des feuilles contaminées permet de déterminer le taux de recouvrement des feuilles et des stomates par les particules riches en métaux.

La microspectrométrie Raman a été utilisée pour étudier la composition moléculaire des particules piégées à la surface des feuilles. Les analyses Raman ont été effectuées avec un Microspectromètre

LabRam HR UV 800 (Horiba, Jobin-Yvon) équipé d'un objectif Mitutoyo 40x. La diffusion Raman est excitée par un laser UV à une longueur d'onde de 325 nm. Les analyses ont été réalisées sur les zones riches en métaux précédemment identifiées par microscopie électronique. L'identification des espèces moléculaires (position et intensité des bandes) a été réalisée par comparaison de spectres d'espèce pure (base de données ou références établies dans les mêmes conditions d'analyse).

2. 4. 3. Impacts génotoxiques et effet sur la photosynthèse de la contamination

Des tests biologiques ont été utilisés pour compléter les observations effectuées en micro-analyse pour les choux exposés aux particules modèles en conditions contrôlées. Au total, 6 échantillons de feuilles de différents plants ont été utilisés pour chaque condition (type de particules, plants témoins et exposition ou non au TCA). Les résultats des paramètres biologiques ont été interprétés en s'appuyant sur des calculs statistiques (statistiques descriptives) ainsi que sur l'analyse des différences grâce au test non paramétrique de Dunn. Ces calculs statistiques ont été réalisés grâce au logiciel XL Stats. Une analyse de la variance et un ajustement de Bonferroni ont été effectués par comparaison de paires multiples entre les données des plants témoins et chaque plant contaminé, dans le cas de plants non traités et de plants traités par le TCA. Le seuil de significativité retenu est $p < 0,05$.

Le test des comètes mesure le niveau de fragmentation de l'ADN (effet clastogène des polluants) de cellules individualisées. Il se base sur la migration différentielle des fragments d'ADN en fonction de leur taille sous l'effet d'un champ électrophorétique (Rzepka *et al.*, 2010). C'est ainsi que l'on observe *in fine* des figures en forme de comètes, dont la queue est constituée d'une traînée de fragments d'ADN plus courts, et la tête par les fragments d'ADN les plus intacts.

Le déroulement de l'ADN qui précède l'électrophorèse se fait en conditions alcalines (pH ≥ 13), ce qui permet de détecter les cassures simples, les double brins et les sites alcali-labiles. Le protocole utilisé est adapté de celui de Gichner *et al.* (2007). Dans un premier temps, les noyaux sont récupérés grâce à la coupe d'échantillons de feuilles dans un tampon de broyage (Tampon Tris-HCl, pH : 7,5). Ils sont alors englobés dans un gel d'agarose (LMPA 1 % dans du PBS : tampon phosphate salin) que l'on dépose sur une lame de microscope. Après refroidissement, ce dépôt est recouvert d'une seconde couche d'agarose (LMPA 0.5 % dans du PBS). Les lames sont ensuite

incubées dans un tampon d'électrophorèse basique (H_2O , EDTA, NaOH 10N, pH=13) pour faciliter la dénaturation, la détorsion de l'hélice et l'exposition des sites sensibles aux agents alcalins. L'ADN ainsi relâché est soumis à une électrophorèse (5 minutes, 25V, 30mA). L'observation des lames se fait après neutralisation du pH dans 3 bains successifs (tampon Trizma Base, Sigma, pH=7,5) et déshydratation à l'éthanol puis séchage à température ambiante. Cette observation est réalisée à l'aide d'un microscope à fluorescence couplé à un dispositif d'analyse informatique. Les lames sont révélées à l'aide de 25 μ l d'iode de propidium déposés sur la préparation. Le logiciel Comet Assay IV (Perspective Instrument Ltd) calcule différents paramètres tels que le pourcentage d'ADN dans la queue des comètes. Plus ce pourcentage est élevé, plus l'ADN est considéré endommagé. 30 noyaux sont observés sur chaque lame, soit un total de 90 par condition d'exposition.

L'activité photosynthétique de la plante a été mesurée par fluorimétrie (PAM-2100 Portable Chlorophyll Fluorometer, Walz). Cette mesure permet de mesurer la fluorescence de la chlorophylle présente dans la feuille et met en évidence la perturbation de la photosynthèse. Plus précisément, elle montre une atteinte du photosystème II, ensemble pigmentaire intervenant très en amont de la phase claire. La détermination la plus pertinente de l'activité photosynthétique est effectuée par l'obtention de trois paramètres principaux qui sont F_o , F_m et $F_v:m$ mesurés directement sur les feuilles des végétaux conservés au préalable à l'abri de la lumière pendant 15 minutes minimum. F_o et F_m représentent respectivement le rendement minimal et le rendement maximal de fluorescence d'un échantillon adapté à l'obscurité. Le paramètre $F_v:m$ correspond au rapport F_v/F_m qui est une mesure du rendement quantique maximal fluorescence (i.e dans des conditions optimales, après adaptation à l'obscurité). Ce paramètre est calculé à partir des valeurs de F_o et F_m obtenues selon l'équation : $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$

Avec des échantillons pleinement actifs adaptés à l'obscurité, $F_v:m$ peut atteindre une valeur maximale avoisinant les 0,86 correspondant à un rapport F_m/F_o d'environ 7. Pour notre étude, 3 valeurs de F_v/F_m par plant ont été mesurées. Les valeurs obtenues sont alors comparées à la valeur maximale de F_v/F_m pouvant être atteinte.

3. Résultats et discussion

3.1. Caractérisations physico-chimiques des particules

La distribution granulométrique des particules pour les échantillons PM_{10} et PM_{1} prélevés le matin (am) et l'après-midi (pm) estimée à partir de l'analyse d'images est présentée sur la figure 2. Pour tous les échantillons, la distribution des particules est unimodale avec 66 ± 4 % des particules ayant une taille comprise entre 0,5 et 2 μ m. Ces résultats sont en accord avec la distribution en taille des particules collectées dans les ateliers de l'usine et à l'émission (Uzu *et al.*, 2011). Les auteurs ont montré que 40 % (en masse) des particules sont de taille inférieure à 2,5 μ m.

La proportion de particules dans l'air ambiant (PER), exprimée en nombre de particules par m^3 , peut être calculée à partir de l'estimation du nombre de particules déposées sur le support selon l'équation suivante :

$$PER = \frac{\text{Nombre de particules déposées sur une lame}}{\text{Volume total d'air prélevé}}$$

Le nombre de particules totales déposées sur la lame est estimé à partir de l'analyse de 10 images réalisées en MEB-EDX (images SE) pour chaque échantillon. Le volume d'air prélevé moyen pour l'ensemble des échantillons est de 0,315 m^3 pour un temps d'échantillonnage de 30 minutes.

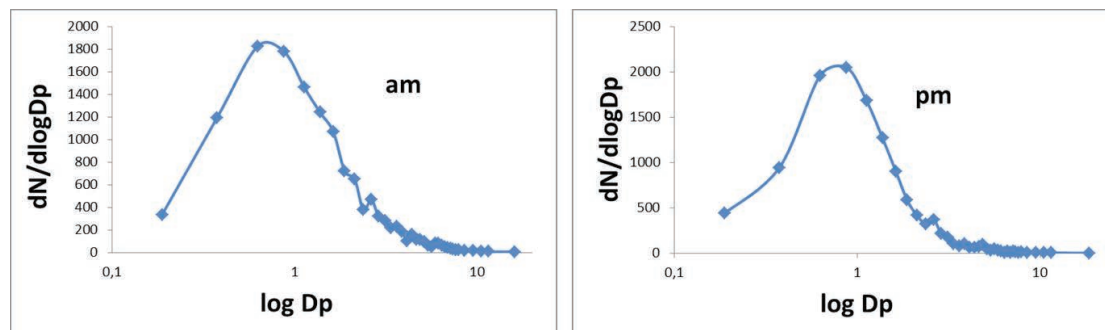


Figure 2. Distribution granulométrique obtenue par traitement d'image électronique, pour le matin (am) et pour l'après-midi (pm).

Particle size distribution obtained by image analysis of the SE images acquired for the morning (am) and the afternoon (pm) samples.

Un calcul identique est réalisé à partir des images BSE pour déterminer la proportion de particules contenant uniquement du plomb.

La figure 3 représente le nombre total de particules au sein des échantillons PM_{10} et PM_1 collectés le matin et l'après-midi pour une journée d'activité caractéristique ainsi que la proportion de particules riches en plomb. Quelle que soit la classe granulométrique considérée (i.e. PM_1 ou PM_{10}), les résultats montrent que le nombre de particules dans l'air ambiant est plus important le matin que l'après-midi. Pour les PM_{10} , le nombre de particules est 2 fois plus important le matin alors que pour les PM_1 il est 4 fois supérieur. Cette tendance est en accord avec les teneurs moyennes en PM_{10} et $PM_{2.5}$ mesurées au voisinage de l'usine durant la période de prélèvement. Le matin, la teneur moyenne en PM_{10} et $PM_{2.5}$ s'élève à $30 \mu\text{g}/\text{m}^3$ et $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$ respectivement alors que pour l'après-midi, les teneurs mesurées sont respectivement de $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$ et $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Les teneurs plus élevées en particules le matin s'expliquent par le chargement des fours en batteries broyées, opération réalisée en début de journée générant une importante émission diffuse de particules (Uzu *et al.*, 2011). Les résultats présentés sur la figure 3 montrent également un nombre plus important de particules fines PM_1 (80 %) comparé au nombre de particules dans les PM_{10} . Les particules contenant du plomb se trouvent essentiellement dans les fractions les plus fines. En effet, le nombre de particules riches en Pb peut atteindre jusqu'à 54 % du nombre total de particules de la fraction fine (échantillon am).

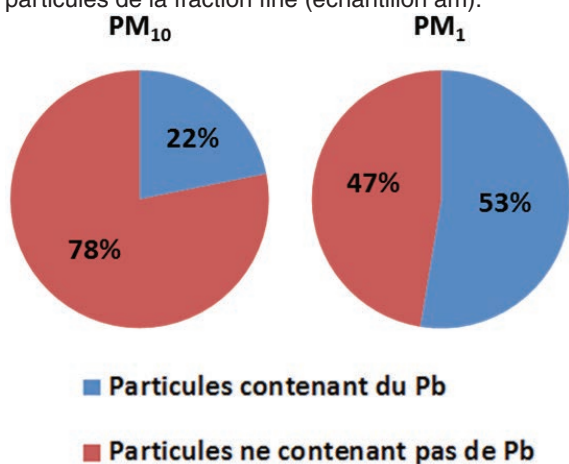


Figure 3. Concentration en particules (en nombre/ m^3) et teneur en plomb dans chaque fraction granulométrique.
Particle number concentration (in number/ m^3) and Pb ratio for each size fraction.

La composition élémentaire des particules individuelles obtenue par microscopie électronique analytique est présentée dans le tableau II. Les PM_{10} contiennent essentiellement des particules contenant

Na (dans 81 % des particules), S (86 %) et Fe (51 %). Dans les PM_{10} , le plomb est présent dans 6 % des particules et est associé à S, Cl et Fe. Il est intéressant de noter que la plupart des particules riches en Pb contiennent également de l'arsenic (As) (présent dans 69 % des particules contenant du plomb).

Concernant les PM_1 , 46 % des particules contiennent du plomb. Pb est essentiellement associé à Na et S (92 %, 62 % respectivement), et dans une proportion moindre avec Fe et Cl (54 % et 46 % respectivement). Les particules ne contenant pas de plomb sont essentiellement composées de Na et S. L'analyse par microspectrométrie Raman a permis d'identifier les espèces moléculaires et d'établir la proportion de ces espèces dans les PM_{10} et PM_1 (figure 4). Trois principales espèces de plomb ont été identifiées au sein des échantillons, i.e. $\alpha\text{-PbO}$, PbO.PbSO_4 et PbSO_4 . En outre, $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (hématite), Na_2SO_4 (thénardite) et $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (gypse) sont systématiquement observés dans tous les échantillons. Ces composés sont caractéristiques des espèces émises par les ateliers de l'usine (Uzu *et al.*, 2011). Comme attendu, les espèces contenant Pb sont principalement présentes dans les PM_1 . L'association Pb/S est identifiée comme étant PbSO_4 et PbO.PbSO_4 en large proportion dans les échantillons (90 % des espèces en plomb sont des sulfates). L'écart observé entre les concentrations élémentaires en Pb (déterminées par MEB-EDX) et la proportion d'espèces contenant du Pb (obtenue par microspectrométrie Raman) peut s'expliquer par la présence de particules de Pb/Cl, détectables en microanalyse X mais non détectables en Raman (PbCl_2 est un composé non actif en Raman). Les PM_{10} sont composés essentiellement de sulfates de sodium, de gypse et d'oxydes de fer en accord avec l'analyse élémentaire.

Il est à noter qu'en moyenne 50 % des particules analysées sont composées de plus d'une espèce chimique. L'imagerie Raman a permis de mettre en évidence l'hétérogénéité des particules individuelles. Quelle que soit la fraction granulométrique considérée, 30 % des particules contenant Pb sont agrégées à des particules de Na_2SO_4 et/ou avec $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

Les analyses de surface des particules ont été réalisées par ToF-SIMS pour les échantillons de PM_{10} et PM_1 . Les fragments moléculaires caractéristiques identifiés sur les spectres de masse obtenus en modes positif et négatif sont présentés dans le tableau III. La présence de PbSO_4 , Fe_2O_3 et Na_2SO_4 identifiée par microspectrométrie Raman a été confirmée en surface des particules par la présence des fragments moléculaires caractéristiques de ces espèces.

Des fragments moléculaires supplémentaires tels que $\text{PbNaS}_2\text{O}_8^-$ et $\text{PbKS}_2\text{O}_8^-$ sont également observés sur les spectres de masse et peuvent être attri-

Tableau II. Composition élémentaire (% en nombre) des particules individuelles, obtenue par microscopie électronique analytique pour les PM_{10} et les PM_1 .

Elemental composition (% number) of individual particles obtained by scanning electron microscopy for PM_{10} and PM_1 .

Elément	Na	S	Fe	Cl	Pb
PM_{10}	81%	86%	51%	43%	6%
PM_1	33%	95%	48%	24%	46%

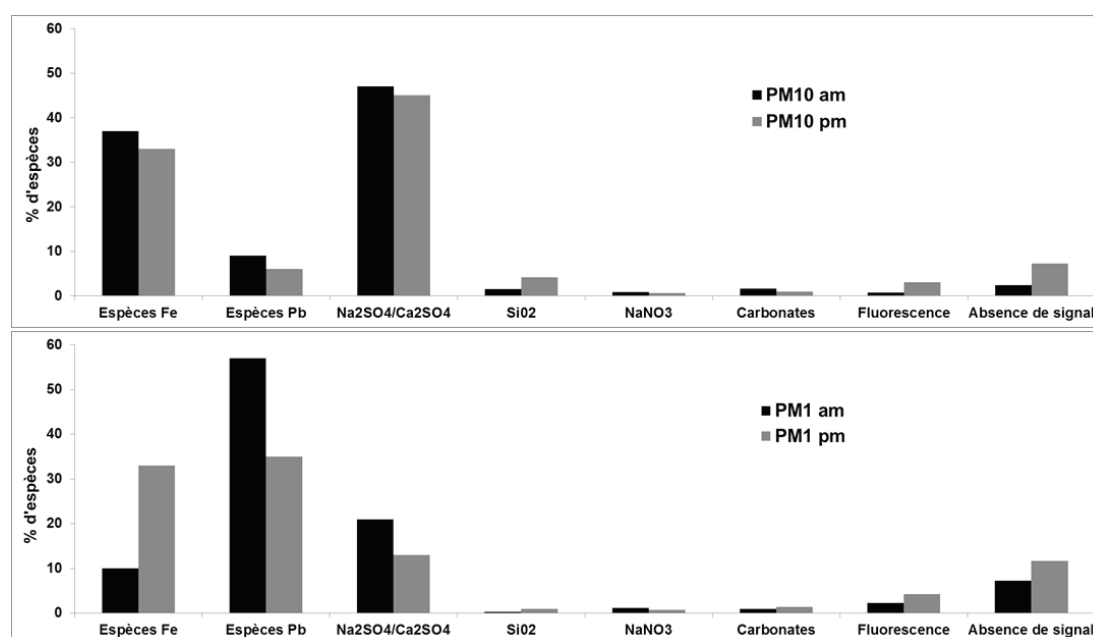


Figure 4. Distribution des espèces présentes dans les PM_{10} et PM_1 , obtenue par analyse Raman ponctuelle automatisée (200 particules par échantillon).

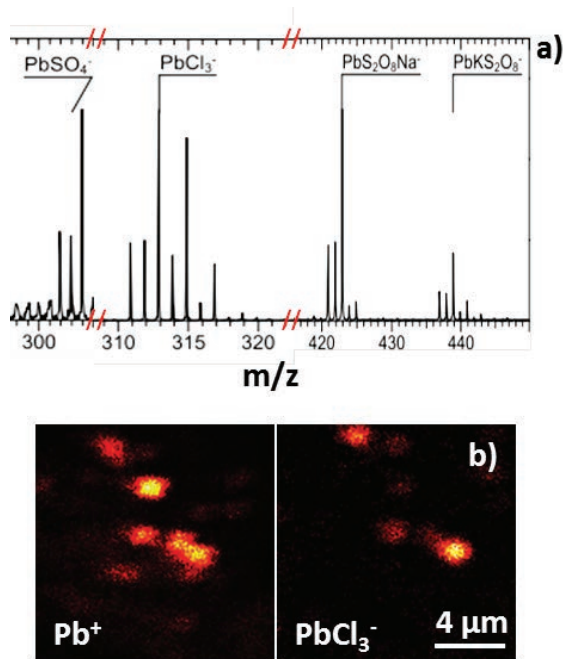
Relative proportion of molecular species within PM_{10} and PM_1 samples obtained by automated Raman analysis (200 particles for each sample).

Tableau III. Fragments moléculaires obtenus par analyse ToF-SIMS en mode positif et en mode négatif.

Molecular clusters obtained by ToF-SIMS analysis in positive and negative modes from particle surface.

Sample	PM_{10}	PM_1
Positive clusters	Fe^+ , Pb^+ , Na_3SOH^+ , $Na_3SO_3^+$, $Na_3SO_4^+$	Fe^+ , Pb^+ , $PbSO_5H^+$, $Na_3SO_3^+$, $Na_3SO_4^+$, $PbCl^+$
Negative clusters	CaS^- , $CaSO^-$, SO_4H^- , SO_3^- , SO_4^- , $CaSOH^-$, CaH_2SO^- , $FeCl_3^-$, $PbCl_2^-$, $PbCl_3^-$	SO_2^- , SO_3^- , SO_4^- , SO_4H^- , $CaSOH^-$, $CaSO_5H^-$, CaH_2SO^- , $FeCl_3^-$, $PbCl_3^-$, $PbClO^-$, $PbSO_4^-$, $PbS_2O_8Na^-$, $PbKS_2O_8^-$

bués à des sulfates mixtes Pb/Na et Pb/K (figure 5a). L'analyse de surface met en évidence la présence de fragments moléculaires contenant Cl tels que PbCl_2^- , PbCl_3^- , PbClO^- , PbCl^- et FeCl_3^- . Ces fragments moléculaires peuvent être attribués à des espèces telles que PbCl_2 , FeCl_3 et $\text{Pb}(\text{ClO}_4)_2$. Les images TOF-SIMS reconstruites à partir de l'intensité des pics de masse sélectionnés montrent que les espèces chlorées se trouvent principalement à la surface de particules riches en plomb (figure 5b). Cette observation montre la présence de composés solubles de type PbCl_2 potentiellement plus disponibles en surface des particules ($K_s[\text{PbCl}_2] = 1,7 \cdot 10^{-5}$, $K_s[\text{PbSO}_4] = 1,8 \cdot 10^{-8}$).



Figures 5. a) Spectres de masse des principaux clusters de Pb détectés b) Distribution des clusters en surface des particules par imagerie ToF-SIMS dans les PM_{10} .

a) Mass spectra of the main detected Pb clusters b) Distribution of clusters on particles surface by ToF-SIMS imaging for the PM_{10} size fraction.

Les compositions élémentaires et moléculaires des particules prélevées en proximité des végétaux montrent un enrichissement en Pb et en Fe comparées à celles des particules prélevées dans les ateliers (Uzu *et al.*, 2011). Cependant, nous n'observons pas de modifications chimiques des particules lors de leur parcours dans l'atmosphère proche des sources émettrices. En revanche, le plomb et les métaux associés (As notamment) sont principalement concentrés dans la fraction fine (PM_{10}) des retombées atmosphériques.

3. 2. Impact des retombées atmosphériques sur les plantes potagères

3. 2. 1. Concentrations en métaux dans les feuilles de choux exposées aux retombées atmosphériques

La concentration en métaux dans les feuilles de choux a été déterminée pour les plantes traitées et non traitées avec le TCA (voir § 2.2.1) exposées aux retombées atmosphériques pendant 6 semaines ; elle est présentée figure 6.

Les résultats des analyses ICP-MS montrent l'accumulation en Pb mais également la présence des éléments As, Cd et Sb dans les feuilles exposées. En revanche, les concentrations en Zn et Cu dans les plants contaminés sont voisines de celles des plants témoins. Le cuivre et le zinc sont des éléments essentiels à la croissance de la plante et sont retrouvés dans les tissus végétaux. Par ailleurs, bien que détectés dans les particules émises, ces éléments sont en faible concentration dans les échantillons pré-

levés à l'émission (Uzu *et al.*, 2011). L'exposition aux particules n'induit pas une accumulation significative en Cu et Zn dans les feuilles des plantes. Comme attendu, les niveaux de concentrations en Pb mesurés dans les feuilles sont élevés par rapport aux autres métaux et atteignent 286 ± 27 mg de Pb/kg poids sec. Ce résultat est en accord avec les données de la littérature montrant une accumulation moyenne en Pb d'environ 7 ppm/jour d'exposition dans les feuilles de salade (Uzu *et al.*, 2010). Même après un lavage soigné, une quantité importante de particules reste fixée sur/dans les feuilles (~75 %). Étonnamment, les taux d'accumulation en métaux sont identiques dans les feuilles traitées et non traitées. La concentration en cires épicuticulaires n'aurait apparemment pas d'influence sur la fixation et l'accumulation des métaux dans des végétaux exposés.

3. 2. 2. Localisation des zones riches en métaux et spéciation du plomb

L'observation par microscopie électronique des faces adaxiales des feuilles contaminées prélevées sur des plants traités et non traités montre la présence de dépôts de particules piégées sur la surface, recouvrant ~ 2 % de la feuille. L'analyse élémentaire des particules fixées en surface révèle principalement la présence de Pb associé ou non avec des particules riches en Fe. Les analyses Raman montrent que le plomb est majoritairement sous forme de sulfates (PbSO_4) et que Fe est sous forme d'oxydes (Fe_2O_3).

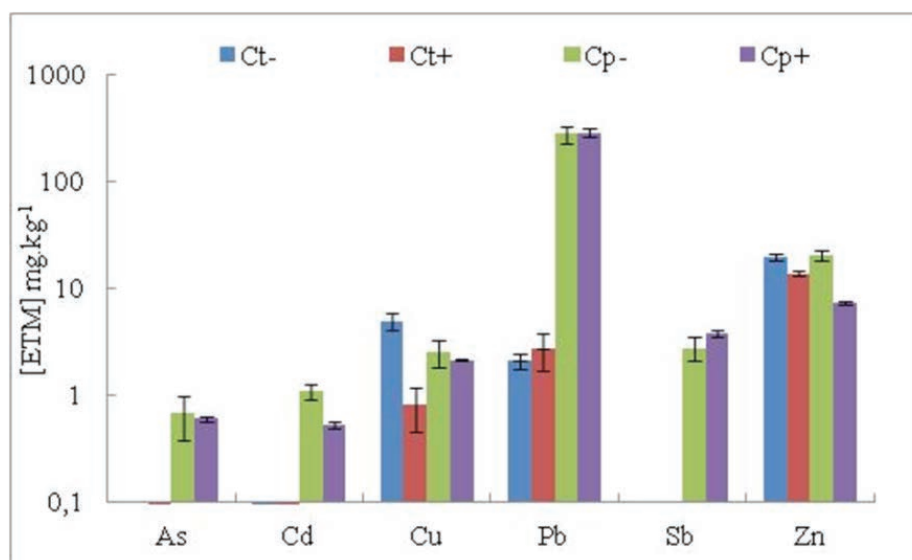


Figure 6. Concentration en métaux dans les feuilles de chou par analyse ICP-MS. Les abréviations Ct et Cp sont utilisées respectivement pour les choux témoins et les choux pollués. Les signes + et - signifient respectivement la présence et l'absence de cires.

Total metal concentrations in cabbage leaves by ICP-MS measurements. Ct and Cp represent control and particles-contaminated cabbages, respectively. The signs + and - indicate the presence and absence of epicuticular waxes, respectively.

Ces espèces ont été également identifiées dans les retombées atmosphériques. En revanche, les composés solubles tels que Na_2SO_4 , majoritaires dans les échantillons de particules prélevées en proximité des végétaux, ne sont pas observés sur la surface des feuilles. La présence majoritaire des composés peu ou pas solubles dans les dépôts est probablement due à la solubilisation des espèces solubles, en particulier Na_2SO_4 , FeCl_3 et PbCl_2 lors de leur séjour sur la surface de la feuille. Ceci laisse supposer un transfert possible du plomb sous forme de Pb^{2+} dans les feuilles.

Par ailleurs, l'observation de la présence de particules fines ($<1 \mu\text{m}$) dans les stomates des feuilles confirme les observations faites dans d'autres travaux (Birbaum *et al.*, 2010 ; Eichert *et al.*, 2008 ; Schreck *et al.*, 2012 ; Uzu *et al.*, 2010) montrant ainsi une voie possible d'entrée des particules dans les feuilles de végétaux. Enfin, la présence de zones nécrotiques riches en plomb à la surface des feuilles a également été observée. Dans la plupart de ces zones, la spéciation du plomb dans les particules reste inchangée (PbSO_4). Les particules peuvent être ou non piégées par les cires épicuticulaires. Les études précédentes sur des feuilles de salades contaminées par le même type de particules montrent des résultats similaires (Schreck *et al.*, 2012, Uzu *et al.*, 2010). Toutefois, dans certaines de ces nécroses, nous avons constaté la formation de précipités contenant Pb, P et Cl. Ces précipités semblent se former dans la cuticule et ce, quelle que soit son épaisseur (figure 7).

La néoformation de composés tels que la pyromorphite ($\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$) est généralement identifiée dans les racines de végétaux contaminés par voie racinaire (Antibus *et al.*, 1997 ; Bolan *et al.*, 2014 ; Laurette *et al.*, 2012), elle résulte d'un processus biologique d'immobilisation du plomb par les végétaux (Chrysochoou *et al.*, 2007 ; Cotter-Howells, 1996 ; Hashimoto *et al.*, 2009 ; Miretzky et Fernandez-Cirelli, 2008 ; Nriagu, 1973 ; Park et Bolan, 2013, Ruby *et al.*, 1994). En revanche, à notre connaissance, la littérature ne relate pas la formation de phosphates de Pb lors d'un éventuel transfert foliaire de Pb^{2+} via les feuilles. Il est possible d'envisager que le processus nécrotique induise une fuite du contenu cellulaire (qui pourrait être due à une altération de la membrane suite à un stress oxydant ou à la présence de métaux à proximité) qui modifie les conditions de pH et la présence de certains éléments à proximité des particules provoquant la précipitation de la pyromorphite.

Il est à noter que les études réalisées précédemment sur le transfert foliaire de particules dans les feuilles de salade montrent principalement la carbonatation des particules de sulfate de Pb dans les nécroses et/ou un phénomène d'endocytose sans changement de composition des particules (Birbaum *et al.*, 2010 ; Nair *et al.*, 2010 ; Samaj *et al.*, 2004 ; Terzaghi *et al.*, 2013).

L'observation en microscopie électronique de coupes transversales de feuilles traitées par du TCA montre la présence de fines particules en surface,

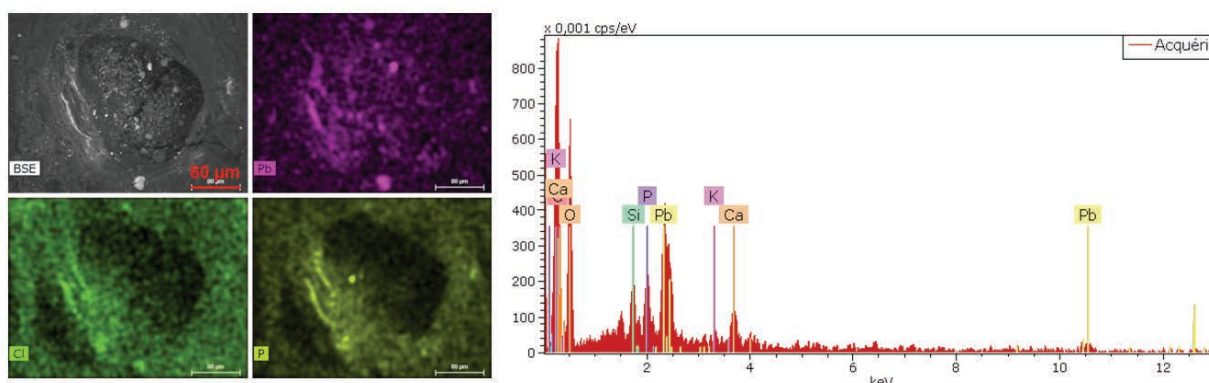


Figure 7. Formation de précipités riches en Pb, P et Cl observés dans la cuticule.
Formation of Pb, P and Cl rich precipitates in the cuticle. Elemental cartography and EDX spectrum.

piégées dans les cires épicuticulaires résiduelles mais également dans les tissus de la feuille (figure 8). Ces observations montreraient le transfert des particules les plus fines (< 1 μ m) vers le mésophylle. Ceci peut résulter soit du transfert des fines particules *via* les stomates en accord avec des travaux antérieurs (Eichert *et al.*, 2008 ; Nair *et al.*, 2010), soit de la dissolution et précipitation de composés riches en Pb dans les tissus. Plusieurs auteurs ont proposé que les particules puissent être piégées dans la cuticule et ensuite être diffusées dans les tissus de la feuille, après dissolution ou translocation dans la cuticule (Schreck *et al.*, 2012 ; Uzu *et al.*, 2010).

Ces premiers travaux basés sur des observations réalisées par microscopie ne permettent pas de mettre en évidence l'influence de la cuticule sur l'accumulation des métaux dans les feuilles de végétaux. En effet, les mêmes phénomènes (accumulation en surface, taux de recouvrement, spéciation, formation de nécroses) sont observés dans les feuilles de plants traités et non traités.

3. 3. Exposition des choux à des particules modèles en conditions contrôlées

Afin de mieux comprendre l'impact génotoxique des particules riches en métaux et d'étudier l'influence des cires épicuticulaires sur l'accumulation des métaux, des choux ont été exposés à des particules modèles. Les expériences ont été réalisées en chambre d'exposition en conditions contrôlées comme détaillé dans le § 2.2.2.

3. 3. 1. Localisation des zones riches en métaux et spéciation

Dans cette étude, des feuilles de choux traités et non traités ont été exposées pendant 5, 10 et 15 jours à des particules monométalliques non solubles de PbSO₄, CuO et CdO. Les observations réalisées par microscopie électronique et microscopie optique sur les feuilles des plants non traités montrent la présence de particules piégées sur les surfaces des feuilles sans changement notable de l'aspect des feuilles,

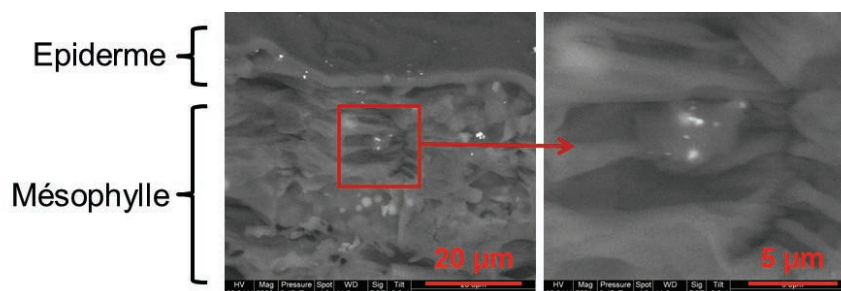


Figure 8. Coupe transversale d'une feuille traitée par du TCA montrant l'intégration des particules dans les cellules du mésophylle.

Cross section of TCA-Treated leaf showing the integration of particles in the cells of the mesophyll.

ni de la répartition des particules sur la surface des feuilles (~1,5 %), et ce, quel que soit le temps d'exposition. Les analyses par microspectrométrie Raman montrent les spectres caractéristiques des composés purs (PbSO_4 , CdO , CuO) sans modification de spéciation des métaux.

En revanche, bien que le taux de recouvrement des feuilles en particules semble identique, les observations réalisées sur les feuilles des plants traités par le TCA révèlent la présence de nécroses probablement induites par les particules, et ce quel que soit le type de particules. Aucune transformation chimique des particules en surface des feuilles ou dans les nécroses n'a été observée.

L'observation de coupes transversales de feuilles des plants traités montre le transfert des particules plus en profondeur dans les tissus, probablement lié au transfert *via* les stomates, comme montré précédemment (Schreck *et al.*, 2012 ; Uzu *et al.*, 2010). Il semblerait que l'épaisseur de la cuticule ne joue pas un rôle sur la quantité de particules retenues en surface mais, comme attendu, elle sert de barrière protectrice des tissus et limite le processus de formation de nécroses induit par les particules. Les stomates semblent une voie privilégiée de transfert des fines particules dans le mésophylle.

3. 3. 2. Impacts génotoxiques de contamination des feuilles et rôle sur l'activité photosynthétique

Une mesure de l'activité photosynthétique de la plante pour chaque temps d'exposition a été effectuée. Les résultats sont présentés figure 9. Les mesures de fluorescence de la chlorophylle montrent que le type de particules ayant le plus d'impact sur l'activité photosynthétique des plants est CuO (F_v/F_m le plus bas). Vient ensuite CdO et enfin PbSO_4 . Cette tendance est plus marquée pour les plants de chou traités et dépend du temps d'exposition.

L'effet du cuivre est attendu mais laisse supposer qu'une partie des particules de CuO se sont dissoutes, puisque seul Cu sous forme ionique possède une action sur les mécanismes cellulaires (Maksymiec, 1997).

Même si le rôle protecteur de la cuticule face aux agents toxiques est clairement mis en évidence par les tests génotoxiques et les mesures de l'activité photosynthétique, il semblerait qu'une partie des métaux soit présente dans les tissus induisant des mécanismes cellulaires complexes. Nos expérimentations ne permettent pas de mettre en évidence si ces mécanismes sont induits par la présence des métaux sous

forme ionique (après dissolution, même très partielle, des particules) ou par le transfert de particules dans les tissus. En effet, les tailles de particules (notamment pour CdO et CuO) et leur présence abondante dans les stomates laissent supposer un transfert foliaire même limité.

Ces mesures ont été complétées par un test des comètes effectué sur les choux exposés en conditions contrôlées, comme détaillé dans le § 2.4.3. L'ensemble des résultats est présenté figure 10. Les graphes montrent clairement que la génotoxicité dépend du type de particules auxquelles les feuilles ont été exposées, du temps d'exposition et de la concentration en cires épicuticulaires ; le TCA n'étant pas génotoxique pour la plante à la concentration utilisée (Garrec *et al.*, 1995 ; Rzepka, 2008).

Pour CuO : A $t = 5$ jours le test des comètes montre que les particules de CuO ont un effet génotoxique sur la plante, que ce soit pour les choux traités ou non ($p < 0,0001$ pour le chou non traité et $p = 0,006$ pour le chou traité). Il est bien connu que même à des concentrations micromolaires, Cu peut causer des dommages à l'ADN (Maksymiec, 1997). Pour les plants non traités, ces effets ne sont visibles qu'au 5^e jour d'exposition. Après 5 jours d'exposition, la plante mettrait en jeu des mécanismes de réparation, compensant alors la génotoxicité du cuivre. En revanche, une forte génotoxicité est observée à 10 jours d'exposition pour les plants traités, mais de même que pour les plants non traités, la plante semble mettre en place des mécanismes de réparation.

Pour CdO : Les effets observés pour CdO sont similaires à ceux observés pour CuO . Peu d'effets sont observés à $t = 5$ jours pour les plants contaminés par CdO ($p = 0,227$ pour le TCA et $p = 0,029$ pour le chou non traité). Après 10 jours d'exposition, seuls les plants traités sont affectés, montrant le rôle protecteur de la cuticule. À 15 jours d'exposition, les effets observés diminuent. Ces résultats montrent que CdO endommage très peu l'ADN quel que soit le temps d'exposition considéré. Or le cadmium est considéré comme un élément génotoxique lorsqu'il est introduit sous forme de Cd^{2+} (Cuny et Van Haluwyn, 2001 ; Cuny *et al.*, 2004 ; Rzepka-Cuny et Cuny, 2011). Dans nos conditions expérimentales, les particules resteraient piégées en surface (dans les cires épicuticulaires) sans effet délétère pour la plante.

Pour PbSO_4 : Les résultats montrent que PbSO_4 a un effet génotoxique particulièrement important sur les choux traités au TCA, c'est-à-dire sans cuticule. En effet, une significativité $p < 0,0001$ est obtenue pour le TCA alors le chou non traité présente une valeur de $p = 0,599$ à 5 jours d'exposition. La diminution de la quantité de cires épicuticulaires fragiliserait les plants

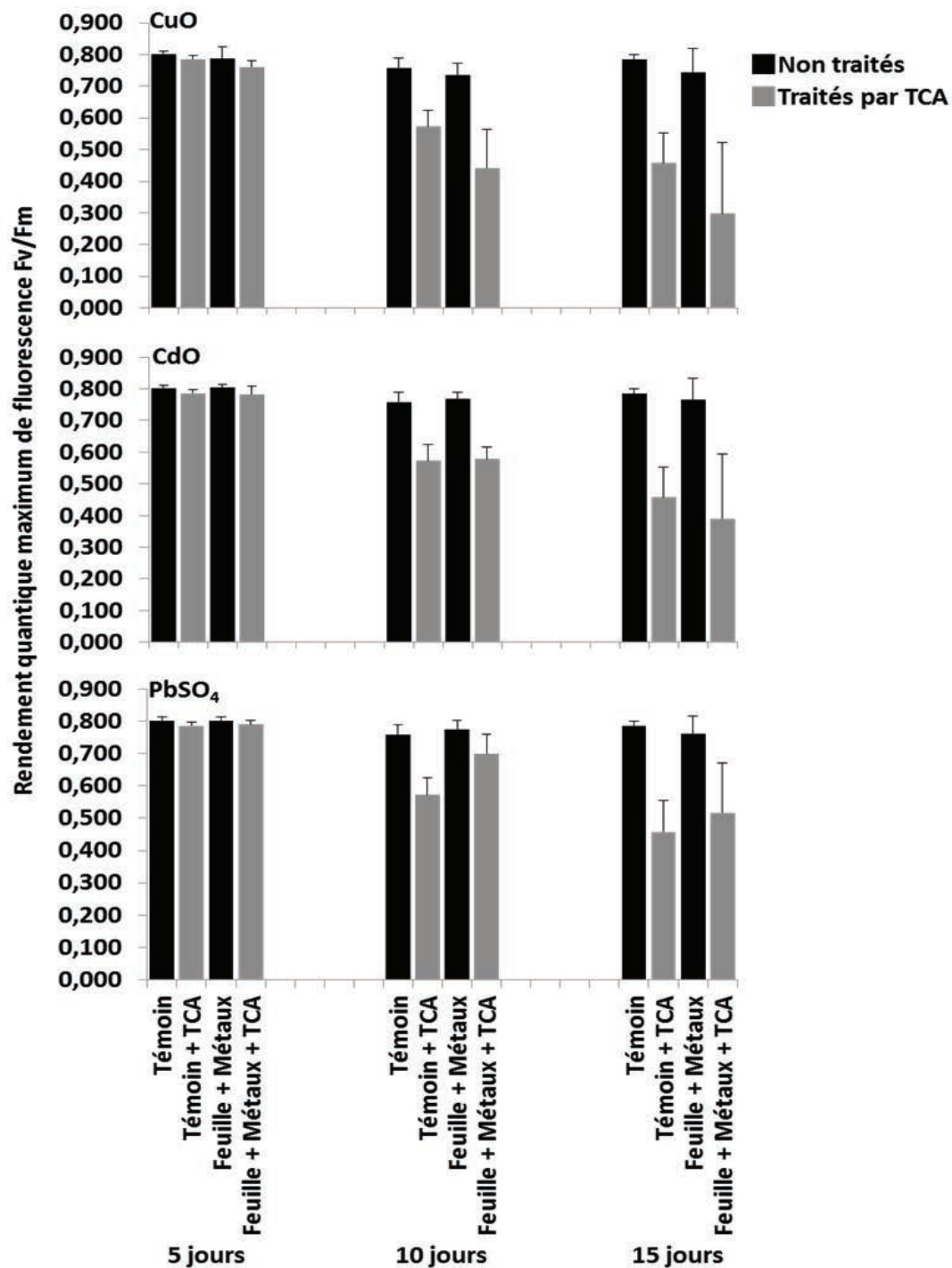


Figure 9. Valeurs moyennes de Fv/Fm obtenues par mesure de l'activité photosynthétique pour chaque échantillon.

Mean values of Fv/Fm by fluorescence measurement for each sample.

par rapport aux effets du plomb. Après 10 jours d'exposition, le test montre que $PbSO_4$ a un effet génotoxique à la fois sur les choux traités ($p < 0,0001$) et les choux non traités ($p < 0,0001$). Ce phénomène laisse suggérer que la présence des cires épicuticulaires retarderait la survenue des effets génotoxiques. Comme observé précédemment, l'effet génotoxique diminue après 15 jours d'exposition. Il est à noter qu'aucune étude menée sur le plomb n'a jusqu'à maintenant mis en évidence son caractère génotoxique. Ceci nous laisse penser que les effets observés seraient liés à la cytotoxicité du plomb qui se traduirait indirectement

par une génotoxicité, induite par la contamination foliaire.

Il est intéressant de noter que quel que soit le type de particules considéré, plus aucun effet n'est détecté pour les plants traités ou non traités après 15 jours d'exposition. Toutes les conditions présentent moins de 4 % d'ADN endommagé. Ce fait nous permet d'avancer que la plante est capable de se défendre rapidement face aux agressions extérieures telles que le dépôt de particules.

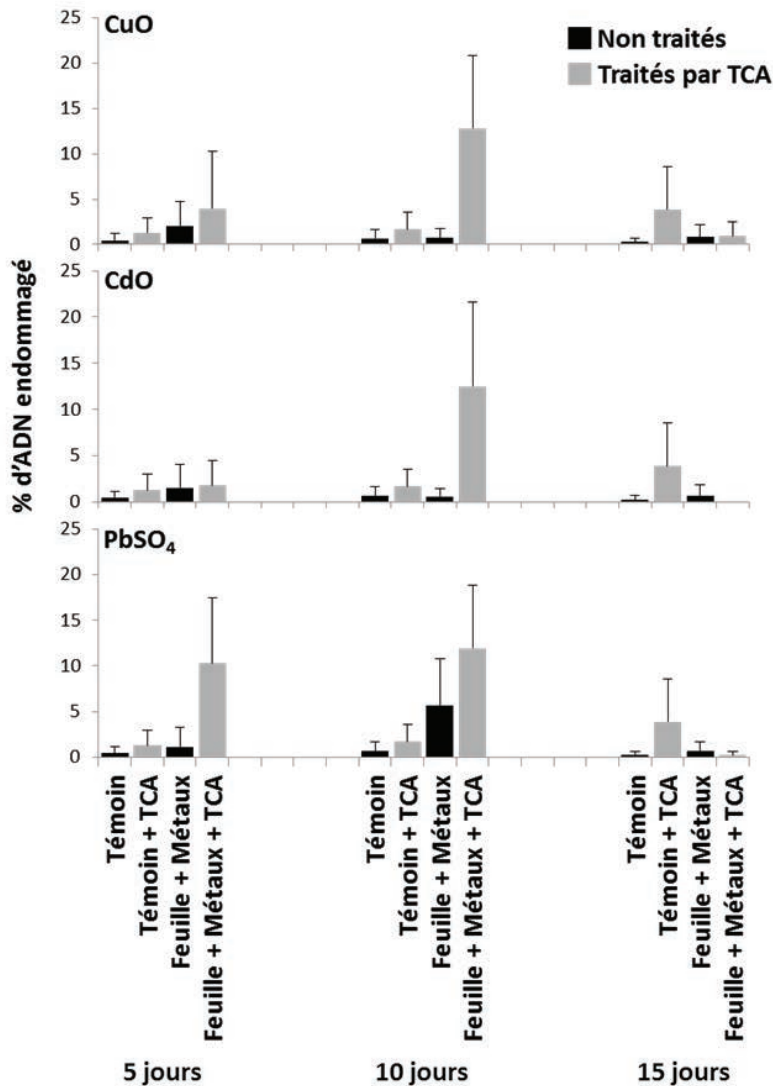


Figure 10. Effet génotoxique des métaux en fonction du temps d'exposition pour des plants non traités et des plants traités par le TCA.

Genotoxic effects generated by metals deposits according to the time of exposure for untreated and TCA-treated plants.

4. Conclusions et perspectives

L'étude de l'accumulation et du transfert de métaux par voie foliaire dans des végétaux (légumes) cultivés en proximité d'usines qui émettent des métaux ou en zones urbaines à densité de population élevée est un enjeu sanitaire. L'évaluation des risques sanitaires nécessite, d'une part, la caractérisation à l'échelle individuelle des particules métalliques retombant en proximité de ces végétaux et, d'autre part, l'étude du devenir des métaux sur/dans les feuilles des végétaux, influencé par de possibles transformations bio-physico-chimiques.

La caractérisation des particules provenant des retombées atmosphériques d'une usine de recyclage de batteries au plomb a été effectuée grâce à un couplage de techniques de microanalyse et d'imagerie qui apportent des informations complémentaires à différentes échelles et pour différents éléments. Les résultats ont montré que les particules riches en plomb se trouvaient majoritairement dans les fractions les plus fines (PM₁₀), considérées comme étant les plus réactives : forte solubilité, capacité à pénétrer dans les stomates... L'analyse par microspectrométrie Raman a montré que le plomb était principalement sous forme de sulfates PbSO₄ et PbO.PbSO₄ en mélange avec d'autres espèces (Na₂SO₄ et Fe₂O₃). Des espèces chlorées (telles que PbCl₂ ou FeCl₃) ont été mises en évidence en surface des particules. Ces espèces plus solubles que les sulfates sont potentiellement plus biodisponibles et risquent donc d'induire des effets délétères plus importants. L'exposition pendant 6 semaines de choux aux retombées atmosphériques de l'usine n'a pas mis en évidence une influence de la concentration en cires sur la quantité de particules accumulées sur les feuilles, ni sur le transfert foliaire. En revanche, les cires épicuticulaires jouent un rôle protecteur et retardent la formation de nécroses. Les stomates sont une voie de transfert importante des particules les plus fines : l'utilisation croissante de na-

noparticules pour diverses applications pourrait donc accroître les concentrations en polluants des végétaux. Pour les plants traités et non traités, des dépôts d'amas de particules piégées en surface des feuilles sont observés et représentent un taux de recouvrement des feuilles ~2 %. Ces amas sont principalement constitués de particules insolubles (PbSO₄ et Fe₂O₃), les composés solubles PbCl₂, FeCl₃ et Na₂SO₄ identifiés dans les retombées ne sont pas observés en surface des feuilles. Ceci laisse supposer qu'ils ont été lessivés de la surface des feuilles lors de l'exposition. Par ailleurs, des précipités riches en Pb, P et Cl ont été mis en évidence dans des zones nécrosées de plants traités. Les résultats montrent la capture/l'immobilisation des métaux par la plante. Cependant, les mécanismes d'internalisation n'ont pu être clairement mis en évidence à partir des seules observations de microscopie. Toutefois, même si la majeure partie des particules restent piégées en surface, un travail récent a montré que les métaux contenus dans les particules étaient largement plus bioaccessibles lorsque les particules sont piégées par les feuilles (Xiong *et al.*, 2014).

L'étude de l'impact de l'exposition aux particules sur l'appareil foliaire de la plante a été réalisée à l'aide de tests de génotoxicité et de la mesure de l'activité photosynthétique. Les expériences ont été menées en chambre d'exposition avec des particules modèles (CdO, CuO et PbSO₄) pour des temps d'exposition de 5, 10 et 15 jours. Les quantités de particules piégées en surface des feuilles sont similaires à celles observées sur les plants exposés aux émissions de l'usine.

Les résultats des tests de génotoxicité et les suivis de la fluorescence de la chlorophylle montrent des comportements similaires pour les particules de CuO et de CdO. Les résultats semblent mettre en évidence la mise en place de mécanismes de compensation, voire de réparation, au sein des cellules. Nos résultats montrent également que la cuticule retarderait les effets phytotoxiques et/ou génotoxiques des particules.

Références bibliographiques

Antibus R.K., Bower D., Dighton J. (1997). Root surface phosphatase activities and uptake of P32-labelled inositol phosphate in field-collected gray birch and red maple roots. *Mycorrhiza*, n° 7, p. 39-46.

Batonneau Y., Bremard C., Gengembre L. (2004). Speciation of PM₁₀ Sources of Airborne Nonferrous Metals within the 3-km Zone of Lead/Zinc Smelters. *Environmental Science & Technology*, n° 38, p. 5281-5289.

Batonneau Y., Sobanska S., Laureyns J., Bremard C. (2006). Confocal Microprobe Raman Imaging of Urban Tropospheric Aerosol Particles. *Environmental Science & Technology*, n° 40, p. 1300-1306.

Birbaum K., Brogioli R., Schellenberg M. *et al.* (2010). No Evidence for Cerium Dioxide Nanoparticle Translocation in Maize Plants. *Environmental Science & Technology*, n° 44(22), p. 8718–8723.

Bolan N., Kunhikrishnan A., Thangarajan R. (2014). Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils – To mobilize or to immobilize? *Journal of Hazardous Materials*, n° 266, p. 141-166.

Bu-Olayan A.H., Thomas B.V. (2009). Translocation and bioaccumulation of trace metals in desert plants of Kuwait governorates. *Research Journal of Environmental Sciences*, n° 3(5), p. 581-587.

Cecchi M., Dumat C., Alric A. *et al.* (2008). Multi-metal contamination of a calcic cambisol by fallout from a lead-recycling plant. *Geoderma*, n° 144, p. 287-298.

Chrysochoou M., Dermatas D., Grubb, D.G. (2007). Phosphate application to firing range soils for Pb immobilization: the unclear role of phosphate. *Journal of Hazardous Materials*, n° 144, p. 1-14.

Cotter-Howells J.D. (1996). Lead phosphate formation in soils. *Environmental Pollution*, n° 9, p. 9-16.

Cuny D., Van Haluwyn C. (2001). Biomonitoring of trace elements in air and soil compartments along the major motorway in France. *Water, Air & Soil Pollution*, n° 125(1-4), p. 273-289.

Cuny D., Van Haluwyn C., Shirali P. *et al.* (2004). Cellular impact of metal trace elements in terricolous lichen *Diploschistes muscorum* (Scop.) R. Sant. – Identification of oxidative stress biomarkers. *Water, Air & Soil Pollution*, n° 152(1-4), p. 55-69.

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

Douay F., Roussel H., Pruvot *et al.* (2008). C. 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*, n° 401, p. 29-38.

Dumat C., Quenea K., Bermond A. *et al.* (2006). Study of the trace metal ion influence on the turnover of soil organic matter in cultivated contaminated soils. *Environmental Pollution*, n° 142(3), p. 521-529.

Duong T.T., Lee B.K. (2011). Determining contamination level of heavy metals in road dust from busy traffic areas with different characteristics. *Journal of Environmental Management*, n° 92(3), p. 554-562.

Eichert T., Kurtz A., Steiner U., Goldbach H.E. (2008). Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles. *Physiologia Plantarum*, n° 134, p. 151-160.

Eom H.J., Jung H.J., Sobanska S. *et al.* (2013). Iron Speciation of Airborne Subway Particles by the Combined Use of Energy Dispersive Electron Probe X-ray Microanalysis and Raman Microspectrometry. *Analytical Chemistry*, n° 85(21), p. 10424-10431.

Faiz Y., Tufail M., Javed M.T. *et al.* (2009). Road dust pollution of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn along Islamabad Expressway, Pakistan. *Microchemical Journal*, n° 92, p. 186-192.

Galsomiès L. (2006). Surveillance des retombées atmosphériques de métaux en France – ADEME (DABEE/DSQA).

Garrec J.P., Henri C., Le Maout L. (1995). Cires épi- et intracuticulaires : étude de leur séparation, de leurs caractéristiques chimiques et de leurs rôles respectifs dans la perméabilité cuticulaire. *Environmental and Experimental Botany*, n° 35(3), p. 399-409.

Geng H., Cheng F.Q., Ro C.U. (2011). Single-Particle Characterization of Atmospheric Aerosols Collected at Gosan, Korea, during the Asian Pacific Regional Aerosol Characterization Experiment Field Campaign Using Low-Z (Atomic Number) Particle Electron Probe X-ray Microanalysis. *Journal of the Air & Waste Management Association*, n° 61(11), p. 1183-1191.

Gichner T., Lovecká P., Kochánková L. *et al.* (2007). Monitoring toxicity, DNA damage, and somatic mutations in tobacco plants growing in soil heavily polluted with polychlorinated biphenyls. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, n° 629(1), p. 1-6.

Gombert S., Asta J., Seaward M.R. (2005). The use of autecological and environmental parameters for establishing the status of lichen vegetation in a baseline study for a long-term monitoring survey. *Environmental Pollution*, n° 135, p. 501-514.

Harrison R.M., Yin J. (2010). Chemical speciation of PM_{2.5} particles at urban background and rural sites in the UK atmosphere. *Journal of Environmental Monitoring*, n° 12, p. 1404-1414.

Hashimoto Y., Takaoka M., Oshita, K., Tanida, H. (2009). Incomplete transformations of Pb to pyromorphite by phosphate-induced immobilization investigated by X-ray absorption fine structure (SAFS) spectroscopy. *Chemosphere*, n° 76, p. 616-622.

Hwang H., Ro C.U. (2006). Single-particle characterization of "Asian Dust" certified reference materials using low-Z particle electron probe X-ray microanalysis. *Spectrochimica acta B*, n° 61(4), p. 400-406.

Johnson J., Harper E.M., Lifset R., Graedel T.E. (2007). Dining at the Periodic Table: Metals Concentrations as They Relate to Recycling. *Environmental Science and Technology*, n° 41(5), p. 1759-1765.

Juan A., Maeder M., Hancewicz T., Tauler R. (2005). Local rank analysis for exploratory spectroscopic image analysis. Fixed size image window-evolving factor analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, n° 77, p. 64-74.

Juan A., Tauler R. (2006). Multivariate curve resolution (MCR) from 2000: progress in concepts and applications. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, n° 36, p. 163-176.

Kang S.J., Hwang H.J., Kang S. *et al.* (2009). Quantitative ED-EPMA combined with morphological information for the characterization of individual aerosol particles collected in Incheon, Korea. *Atmospheric Environment*, n° 43(22-23), p. 3445-3453.

Landrigan P.J., Todd A.C. (1994). Lead-poisoning. *Western Journal of Medicine*, n° 161(2), p. 153-159.

Laurette J., Larue C., Llorens I. (2012). Speciation of uranium in plants upon root accumulation and root-to-shoot translocation: A XAS and TEM study. *Environmental and Experimental Botany*, n° 77, p. 87-95.

Lombi E., Scheckel K.G., Kempson, I.M. (2011). In situ analysis of metal(loid)s in plants: state of the art and artefacts. *Environmental and Experimental Botany*, n° 72, p. 3-17.

Maksymiec W. (1997). Effect of copper on cellular processes in higher plants. *Photosynthetica*, n° 34(3), p. 321-342.

Midander K., Elihn K., Wallén A. *et al.* (2012). Characterisation of nano- and micron-sized airborne and collected subway particles, a multi-analytical approach. *Science of the Total Environment*, n° 427/428, p. 390-400.

Miretzky P., Fernandez-Cirelli A. (2008). Phosphates for Pb immobilization in soils: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 6, p. 121-133.

Moffet R.C., Henn T., Laskin A., Gilles M.K. (2010). Automated Chemical Analysis of Internally Mixed Aerosol Particles Using X-ray Spectromicroscopy at the Carbon K-Edge. *Analytical Chemistry*, n° 82, p. 7906-7914.

Moreno T., Querol X., Alastuey A. *et al.* (2010). Variations in vanadium, nickel and lanthanoid element concentrations in urban air. *Science of the Total Environment*, n° 408(20), p. 4569-4579.

Nair R., Varghese S.H., Nair B.G. *et al.* (2010). Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant Science*, n° 179(3), p. 154-163.

Nowack D., Bucheli T.D. (2007). Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution*, n° 150(1), p. 5-22.

Nriagu J. (1973). Lead orthophosphates II. Stability of chloropyromorphite at 25 °C. *Geochimica and Cosmochimica Acta*, n° 37, p. 367-377.

Park J.H., Bolan N. (2013). Lead immobilization and bioavailability in microbial and root interface. *Journal of Hazardous Materials*, n° 261, p. 777-783.

Pöschl U. (2008). Composition, Transformation and Effects of Nanoparticles in the Atmosphere. *Nanotechnology*, n° 2, p. 195-228.

Rzepka M.A. (2008). Mécanismes d'accumulation et de toxicité des composés organiques volatils chez les végétaux supérieurs. Thèse : université de Lille 2.

Rzepka M.A., Trinh Tran D., Coquelle I. *et al.* (2010). Biomonitoring of indoor air genotoxic properties in ten schools using *Scindapsus aureus*. *International Journal of Environment and Health*, n° 4(2-3), p. 224-234.

Rzepka-Cuny M.A., Cuny D. (2011). Preliminary researches on the use of an air biomonitoring using plants in a complex industrial zone: application of ray-grass in Dunkerque. *Acta Botanica Gallica*, n° 158(3), p. 387-400.

Ro C.U., Hoornaert S., Grieken R.V. (1999). Assessment of homogeneity of candidate reference material at the nanogram level and investigation on representativeness of single particle analysis using electron probe X-ray microanalysis. *Analytica Chimica Acta*, n° 389(1-3), p. 151-160.

Ro C.U., Oh K.Y., Kim H.K. *et al.* (2001). Chemical speciation of individual atmospheric particles using low-Z electron probe X-ray microanalysis: characterizing "Asian Dust" deposited with rainwater in Seoul, Korea. *Atmospheric Environment*, n° 35(29), p. 4995-5005.

Ruby M.V., David A., Nicholson A. (1994). In Situ Formation of Lead Phosphates in Soils as a Method to Immobilize Lead. *Environmental Science & Technology*, n° 28(4), p. 646-654.

Samaj J., Baluska F., Voigt B. *et al.* (2004). Endocytosis, actin cytoskeleton, and signaling. *Plant Physiology*, n° 135, p. 1150-1161.

Sanyal T., Kaviraj A., Saha S. (In press). Deposition of chromium in aquatic ecosystem from effluents of handloom textile industries in Ranaghat-Fulia region of West Bengal, India. *Journal of Advanced Research*.

Schreck E., Foucault Y., Sarret G. *et al.* (2012). Metal and metalloid foliar uptake by various plant species exposed to atmospheric industrial fallout: Mechanisms involved for lead. *Science of the Total Environment*, n° 427-428, p. 253-262.

Schreck E., Bonnard R., Laplanche C. *et al.* (2012). DECA: A new model for assessing the foliar uptake of atmospheric lead by vegetation, using *Lactuca sativa* as an example. *Journal of Environmental Management*, n° 112, p. 233-239.

Sobanska S., Falgayrac G., Laureyns J., Bremard C. (2006). Chemistry at level of individual aerosol particle using multivariate curve resolution of confocal Raman image. *Spectrochimica Acta Part A*, n° 64(5), p. 1102-1109.

Sobanska S., Falgayrac G., Rimetz-Planchon J. *et al.* (2014). Resolving the internal structure of individual atmospheric aerosol particle by the combination of Atomic Force Microscopy, ESEM-EDX, Raman and ToF-SIMS imaging. *Microchemical Journal*, n° 114, p. 89-98.

Taiwo A.M., Beddows D.C.S., Shi Z., Harrison R.M. (2014). Mass and number size distributions of particulate matter components: Comparison of an industrial site and an urban background site. *Science of the Total Environment*, n° 475, p. 29-38.

Terzaghi E., Wild E., Zacchello G. *et al.* (2013). Forest Filter Effect: Role of leaves in capturing/releasing air particulate matter and its associated PAHs. *Atmospheric Environment*, n° 74, p. 378-384.

Uzu G., Sobanska S., Aliouane Y. *et al.* (2009). Study of lead phytoavailability for atmospheric industrial micronic and sub-micronic particles in relation with lead speciation. *Environmental Pollution*, n° 157(4), p. 1178-1185.

Uzu G., Sobanska S., Sarret G. *et al.* (2010). Foliar lead uptake by lettuce exposed to atmospheric fallouts. *Environmental Science & technology*, n° 44(3), p. 1036-1062.

Uzu G., Sobanska S., Sarret G. *et al.* (2011). Characterization of lead-recycling facility emissions at various workplaces: major insights for sanitary risks assessment. *Journal of Hazardous Materials*, n° 186(2-3), p. 1018-1027.

Windig W., Antalek B., Lippert J.L. *et al.* (2002). Combined use of conventional and second-derivative data in the SIMPLISMA self-modeling mixture analysis approach. *Analytical Chemistry*, n° 74, p. 1371-1379.

Xiong T., Lévêque T., Austruy A. *et al.* (2014). Foliar uptake and metal(loid) bioaccessibility in vegetables exposed to particulate matter. *Environment Geochemistry and Health*, n° 36(5), p. 897-909.

Zhang Z., Kleinstreuer C., Donohue J.F., Kim C.S. (2005). Comparison of micro- and nano-size particle depositions in a human upper airway model. *Journal of Aerosol Science*, n° 36, p. 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*, n° 383, p. 81-89.